

# Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Patthy László professzornak szeretnék köszönetet mondani, aki érdemesnek tartott arra, hogy kutatócsoportjában dolgozhassam, és végig támogatta munkámat. Köszönettel tartozom Trexler Máriának azért, hogy végig figyelemmel kísérte munkámat. Sokat tanultam tőle a kísérletes munkához szükséges alaposágról és türelemről. Köszönöm minden munkatársamnak tanácsait és ötleteiket, amelyekkel segítettek munkámat és az értekezés megírását. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Orosz László professzornak, aki a Klasszikus és molekuláris genetika Doktori Program vezetőjeként segített eredményeim elérésében, valamint dr. Horváth Miklósnak, aki közreműködött a betegek kiválasztásában. Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak, hogy a munkával töltött évek alatt végig támogattak.

# Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>1</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. BEVEZETÉS.....</b>	<b>5</b>
<b>II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>7</b>
II.1. A hallásvesztés típusai, kialakulásának okai .....	7
II.2. A DFNA9 típusú hallásvesztés .....	10
II.2.1. A <i>COCH</i> gén és fehérje terméke a cochlin .....	10
II.2.2. Az LCCL domének .....	14
II.2.3. Az A típusú von Willebrand faktor domének .....	16
II.2.4. A DFNA9 típusú hallásvesztést okozó mutációk .....	18
II.2.5. A <i>COCH</i> mutációk hatásának vizsgálata: következtetések a DFNA9 patomechanizmusára .....	19
II.2.6. A cochlin és egyéb extracelluláris mátrix komponensek kölcsönhatásai .....	23
II.2.7. A DFNA9 állapotmodellje .....	24
<b>III. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>25</b>
<b>IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>26</b>
IV.1. Genetikai analízis .....	26
IV.1.1. Beteganyag .....	26
IV.1.2. Genomiális DNS izolálás .....	26
IV.1.3. Mutációk keresése és azonosítása a <i>COCH</i> génben (NM 004086).....	27
IV.2. Rekombináns fehérje konstrukciók előállítása .....	28
IV.2.1. A rekombináns V104del mutációt tartalmazó LCCL domén bakteriális expressziója .....	28
IV.2.2. Az I109N mutációt tartalmazó LCCL domén bakteriális expressziója .....	29
IV.2.3. A vad típusú LCCL domén és az I109N mutáns LCCL domén expressziója <i>Pichia pastorisban</i> ...	30
IV.2.4. A humán cochlin második A típusú von Willebrand faktor (coch/vWFA2) doménjének expressziója és tisztítása .....	31
IV.2.5. A humán cochlin első A típusú von Willebrand faktor (coch/vWFA1) doménjének expressziója ..	32
IV.3. Fehérje elemzések .....	32
IV.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia .....	33
IV.5. Szekvenca elemzések .....	34
IV.6. Fehérje kölcsönhatások vizsgálata .....	34
IV.6.1. Felületi plazmon rezonancia (Surface Plasmon Resonance/SPR) analízis .....	34
IV.6.2. Fémek hatásának vizsgálata a fehérjék kölcsönhatására .....	36
<b>V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK .....</b>	<b>37</b>
V.1. A V104del mutáció azonosítása .....	37
V.2. A mutáció eredetére vonatkozó esetismertetés .....	40
V.3. A V104del és az I109N mutációk hatásának vizsgálata a humán cochlin LCCL doménjének szerkezetére .....	40
V.3.1. A V104del mutációval érintett LCCL domén expressziója .....	40
V.3.2. Az I109N mutációval érintett LCCL domén expressziója <i>Pichia pastorisban</i> és bakteriális expressziós rendszerben .....	42
V.4. Következtetések a DFNA9 patomechanizmusára .....	44
V.5. Fehérje kölcsönhatások vizsgálata .....	45
V.5.1. A cochlin A típusú von Willebrand faktor doménjeinek expressziója és szerkezeti jellemzése .....	46
V.5.2. A coch/vWFA2 domén, a coch/LCCL domén és a humán I., II. és IV. típusú kollagének kölcsönhatásának vizsgálata .....	49
<b>VI.ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>54</b>

VII. HIVATKOZÁSOK.....	56
KÖZLEMÉNYEK.....	65
ÖSSZEFOGLALÓ.....	68
SUMMARY.....	69
CSATOLT KÖZLEMÉNYEK.....	70

## Rövidítések jegyzéke

ADNSHL	autoszómális domináns nem-szindrómás hallásvesztés (autosomal dominant non-syndromic hearing loss)
ARNSHL	autoszómális recesszív nem-szindrómás hallásvesztés (autosomal recessive non-syndromic hearing loss)
CD	cirkuláris dikroizmus (Circular Dichroism)
cDNS	komplementer DNS
CM5	karboximetil
Crip	Ciszteinben gazdag szekréciós fehérje (Cysteine-rich secretory protein)
CUB	komplement komponens C1r/C1s, tengeri sünn epidermális növekedési faktor fehérje, csont morfogenezis fehérje (complement C1r/C1s, sea urchin Epidermal Growth Factor, Bone Morphogenetic Protein) domén
DFN	hallásvesztés (DeaFNess)
DFNA9	autoszómális domináns hallásvesztés, 9. azonosított lokusz (DeaFNess, autosomal dominant, 9th identified locus)
ECM	extracelluláris mátrix
EDC	N-etil-N'-(dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetán-szulfonsav (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
Lfc_tactr	Tachypleus tridentatus rákfaj Limulus C faktora (Limulus factor C_Tachypleus tridentatus)
Lgl	terhesség alatt a magzati tüdőben expresszáldó fehérje (late gestation lung)
MIDAS	fémion-függő kötőhely (Metal Ion Dependent Adhesion Site)
NHS	N-hidroxisuccinimid
NMR	mágneses magrezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
RU	rezonancia egység (Resonance Unit)
SDS/PAGE	nátrium dodecil-szulfát/poliakrilamid gélelektroforézis (sodium dodecyl-sulphate/polyacrilamide gel electrophoresis)

SPR	felületi plazmon rezonancia (Surface Plasmon Resonance)
TORCH	Toxoplazma, Rubella, Citomegalovírus, Herpesz
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometán, 2-amino-2-(hidroximetil) propán-1,3-diol
UV	ultraibolya (Ultraviolet)
vWFA	A típusú von Willebrand faktor domén

# I. Bevezetés

A hallásvesztés a leggyakrabban előforduló érzékelő funkciót érintő betegség. A különböző típusú hallásvesztések kialakulása nagyobb részben genetikai eredetű. Az öröklődő hallásvesztések kb. 70 %-ban egyetlen gén hibájára vezethetők vissza és nagy részük nem jár együtt más tünetekkel. Az elmúlt években intenzív kutatómunka eredményeként számos lokuszt térképeztek és sok hallásvesztés kialakulásáért felelős gént azonosítottak. Újabb gének azonosítása és a gének által kódolt még ismeretlen funkciójú fehérjék megismerése tovább segíti a hallás folyamatának megértését, lehetővé teszi a hatékonyabb genetikai diagnosztikát, és a terápiás lehetőségek tervezését.

Az SZBK Enzimológiai Intézetének Funkcionális Genomika munkacsoportja 2000-ben definiálta önálló szerkezettel rendelkező doménként az LCCL modult, amelyet különböző multidomén fehérjék építőelemeként egyre több fehérjében azonosítanak. E domén típusát először a *Limulus polyphemus* C faktorában, a *Coch-5b2* (cochlin) fehérjében, és az *Lgl1* fehérjében azonosították és jellemezték, innen származik az LCCL elnevezés (Trexler és mtsai, 2000).

A cochlin fehérje a belső fül extracelluláris mátrixának fő komponense. Kutatásaim kezdetén kizárólag a cochlin LCCL doménjében találtak mutációkat, amelyek a DFNA9 típusú, autoszomális domináns öröklődésű hallásvesztés kialakulásáért felelősek. Mivel az LCCL domén fontos szerepet játszik a betegség kialakulásában, munkacsoportunkban részletes szerkezet-funkció vizsgálatok kezdődtek. Külföldi munkacsoporttal együttműködésben 2001-ben meghatározták az LCCL domén NMR szerkezetét és kimutatták, hogy a DFNA9-t okozó mutációk az LCCL domén konzervatív szerkezeti elemeit károsítják és a fehérje aggregációját okozzák (Liepinsh és mtsai, 2001).

A kutatásokba bekapcsolódva doktori munkám egyik célja további mutációk keresése és azonosítása volt a magyar populációban, abban a reményben, hogy új típusú mutációk vizsgálata segítségünkre lesz a betegség patomechanizmusának felderítésében.

Ezen kívül a cochlin fehérje pontos funkciójának meghatározása, hallásban betöltött szerepének megismerése is fontos feladat, hiszen erről máig keveset tudunk. Ezért az ismert irodalmi adatok birtokában célul tűztam ki a cochlin különböző doménjei és a belső fül

extracelluláris mátrixának komponensei között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatát, amelyek elősegítik a cochlin biológiai funkciójának megértését.

## II. Irodalmi áttekintés

### II.1. A hallásvesztés típusai, kialakulásának okai

A hallásvesztés/süketség a leggyakoribb érzékszervi betegség a világon, amely több millió embert érint.

Típusa szerint lehet konduktív, ha a külső és/vagy a középfület érinti (a hang fizikai terjedésének akadályozása áll a háttérben); szenzorineurális, ha a belső fül struktúráit érinti (pl. a cochleát, amely a fizikai hangimpulzusokat elektrokémiai jelként továbbítja a hallóidegen át magasabb szintű agyi központokba); és lehet a kettő kombinációja. A hallásvesztés megjelenhet a beszédképesség kialakulása előtt (prelinguális), illetve a beszéd kifejlődése után (posztlinguális); érintheti az alacsony (<500 Hz), közepes (501-2000 Hz), valamint a magas (>2000 Hz) frekvenciatarományt. Súlyosságát több fokozatban adják meg enyhétől a nagyon súlyos mértékű halláskárosodásig, attól függően, hogy mekkora erősségű hangot (decibel egységben mérve) képes még érzékelni az adott személy. A süketség lehet különböző betegségek velejáró tünete (szindrómás), vagy önálló betegség (nem-szindrómás) (Kochhar és mtsai, 2007).

A süketség kialakulásában környezeti és/vagy genetikai tényezők játszhatnak szerepet. A leggyakoribb szerzett hallásvesztés oka gyermekeknél az ún. „TORCH” organizmusok (Toxoplazma, Rubella, Cytomegalovírus, Herpesz) által okozott prenatális fertőzés, illetve a posztnatális bakteriális eredetű meningitisz. Felnőttkorban leginkább környezeti tényezők járulnak hozzá a szerzett halláskárosodáshoz, mint például a zajos környezet; de az életkorhoz köthető süketség is gyakori. Valószínű, hogy az egyéni halláskárosodásra való hajlam környezeti-genetikai kölcsönhatás eredménye.

Bebecslések szerint 400-ra tehető a különböző genetikai eredetű hallásvesztések típusainak száma (Kochhar és mtsai, 2007). Az esetek többségében a hallásvesztés egyetlen gén hibájának következménye. A monogénis hallásvesztés többféleképpen öröklődhet. Az esetek 80 %-ában autoszomális recesszív az öröklődésmenet, amely jellemzően prelinguális hallásvesztést eredményez; a maradék 20 % autoszomális domináns öröklődésmenetű és posztlinguális. Kevesebb, mint 1%-ban az öröklődés X kromoszómához kötött, vagy mitokondriális (Cryns és mtsai, 2004). Az utóbbi években több, mint 100 szindrómás és nem-szindrómás



lokuszt térképeztek és 46 gént azonosítottak (1. táblázat); továbbá folyamatosan azonosítják a sükettség kialakulásáért felelős gének mutációit (Van Camp és Smith 2008; Hereditary Hearing Loss Homepage [http:// www.webh01.ua.ac.be/hhh/](http://www.webh01.ua.ac.be/hhh/).)

Az öröklődő halláskárosodások több mint 70%-a nem-szindrómás. A különböző nem-szindrómás lokuszokat DFN betűkkel jelölik (DeaFNess). Az öröklődés módja szerint autoszomális domináns lokuszok jele DFNA, az autoszomális recesszívoké DFNB, míg az X kromoszómához kötött lokuszokat DFN-el jelölik. A jelölésekhez kapcsolódó számok a gének felfedezésének sorrendjét mutatják. Fontos tény, hogy néhány recesszív és domináns lokuszt ugyanabba a kromoszomális régióba térképeztek, és az esetek többségében egy gén allélikus variánsait találták meg. Például, mind a DFNB2, mind a DFNA11 lokusz a 11q13.5 kromoszomális régióhoz rendelhető és mindkét esetben a miozinVIIA motorfehérje mutációi okozzák a betegséget.

Gene	Locus	Number of mutations worldwide	Number of mutations in Caucasians	Function in hearing process	OMIM number
<b>ARNSHL</b>					
<i>GJB2</i>	DFNB1	>220	>150	Ion homeostasis	121011
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	44	18	Ion homeostasis	605646
<i>MYO15A</i>	DFNB3	28	0	Hair bundle, motor protein	602666
<i>OTOF</i>	DFNB9	26	17	Exocytosis at auditory ribbon synapse	603681
<i>CDH23</i>	DFNB12	21	12	Hair bundle, adhesion protein	605516
<i>TMC1</i>	DFNB7/11	20	1	Unknown function	606706
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	16	7	Unknown function	605511
<i>TECTA</i>	DFNB21	10	3	Extracellular matrix protein	602574
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	9	0	Hair bundle, cytoskeletal formation	609761
<i>TMIE</i>	DFNB6	8	0	Unknown function	607237
<i>PJVK</i>	DFNB59	7	2	Signalling of hair cells and neurons	610219
<i>ESPN</i>	DFNB36	6	4	Hair bundle, cytoskeletal formation	606351
<i>PCDH15</i>	DFNB23	5	3	Hair bundle, adhesion protein	605514
<i>ESRRB</i>	DFNB35	5	0	Transcription factor	602167
<i>MYO7A</i>	DFNB2	5	0	Hair bundle, motor proteins	276903
<i>GJB6</i>	DFNB1	4	0	Ion homeostasis	604418
<i>TRIC</i>	DFNB49	4	0	Ion homeostasis	610572
<i>TMHS</i>	DFNB67	4	0	Hair bundle, adhesion protein	609427
<i>STRC</i>	DFNB16	3	2	Extracellular matrix protein	606440
<i>CLDN14</i>	DFNB29	3	1	Ion homeostasis	605608
<i>RDX</i>	DFNB24	3	1	Hair bundle, cytoskeletal formation	179410
<i>MYO6</i>	DFNB37	3	0	Hair bundle, motor protein	600970
<i>MYO3A</i>	DFNB30	3	0	Hair bundle, motor protein	606808
<i>SLC26A5</i>		2	2	Molecular motor of OHC	604943
<i>WHRN</i>	DFNB31	2	0	Hair bundle, scaffolding protein	607928
<i>USH1C</i>	DFNB18	2	0	Hair bundle, scaffolding protein	605242
<i>GJB3</i>		2	0	Ion homeostasis	603324
<i>COL11A2</i>	DFNB53	1	0	Extracellular matrix protein	120290
<i>OTOA</i>	DFNB22	1	0	Extracellular matrix protein	607038
<b>ADNSHL</b>					
<i>WFS1</i>	DFNA6/14	19	13	Ion homeostasis	606201
<i>KCNQ4</i>	DFNA2	12	8	Ion homeostasis	603537
<i>COCH</i>	DFNA9	12	8	Extracellular matrix protein	603196
<i>GJB2</i>	DFNA3	11	9	Ion homeostasis	121011
<i>MYO1A</i>	DFNA48	8	8	Unknown function	601478
<i>TECTA</i>	DFNA8/12	8	7	Extracellular matrix protein	602574
<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	6	6	Hair bundle, cytoskeletal formation	102560
<i>EYA4</i>	DFNA10	6	4	Transcription factor	603550
<i>MYH14</i>	DFNA4	5	5	Unknown function	608568
<i>MYO6</i>	DFNA22	5	5	Hair bundle, motor protein	600970
<i>MYO7A</i>	DFNA11	5	4	Hair bundle, motor protein	276903
<i>ESPN</i>		4	4	Hair bundle, cytoskeletal formation	606351
<i>DFNA5</i>	DFNA5	4	2	Unknown function	608798
<i>GJB3</i>	DFNA2	3	1	Ion homeostasis	603324
<i>POU4F3</i>	DFNA15	3	2	Transcription factor	602460
<i>TMC1</i>	DFNA36	2	2	Unknown function	606706
<i>COL11A2</i>	DFNA13	2	2	Extracellular matrix protein	120290
<i>CRYM</i>		2	0	Ion homeostasis	123740
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	2	1	Transcription factor	608576
<i>GJB6</i>	DFNA3	1	1	Ion homeostasis	604418
<i>MYH9</i>	DFNA17	1	1	Hair bundle, motor protein	160775
<i>CCDC50</i>	DFNA44	1	1	Hair bundle, cytoskeletal formation	611051
<i>DIAPH1</i>	DFNA1	1	0	Hair bundle, cytoskeletal formation	602121
<b>X-linked hearing loss</b>					
<i>POU3F4</i>	DFN3	20	19	Transcription factor	300039
<b>Mitochondrial hearing loss</b>					
<i>MT-RNR1</i>	12S rRNA	9	4	RNA translation	561000
<i>MT-TS1</i>	tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	4	1	RNA translation	590080

**1. táblázat. Az eddig ismert 46 nem-szindrómás hallásvesztést okozó gén és azok mutációi (Hilgert és mtsai, 2008)**

A táblázatban szerepel az eddig azonosított összes nem-szindrómás hallásvesztést okozó gén és a világon eddig ismert mutációk száma, amelyből külön kiemelték a kaukázusi populációra vonatkozó adatokat. A géneket a mutációk száma alapján rangsorolták. Minden génnél szerepel a lokusz, a kódolt fehérje hallásban betöltött szerepe és az OMIM azonosító szám. A táblázat négy részre osztható az öröklődés módja szerint: ARNSHL (autoszomális recesszív nem-szindrómás hallásvesztés), ADNSHL (autoszomális domináns nem-szindrómás hallásvesztés), X-kromoszóma-hoz kötött és mitokondriális eredetű hallásvesztés.

A gének azonosítása, valamint a halló- és egyensúlyérzékelő szervet érintő betegségek patogenezisében betöltött szerepének meghatározása fontos törekvés a genetikai diagnosztika területén és a halláskárosodásban szenvedő emberek rehabilitációjában (Hilgert és mtsai, 2008).

## II.2. A DFNA9 típusú hallásvesztés

A DFNA9 (**DeaFN**ess, autosomal dominant, **9**th identified locus) autoszomális domináns öröklődésű, nem-szindrómás szenzorineurális hallásvesztés. A tünetek 20 és 40 éves kor között jelennek meg; a halláskárosodás progresszív, először a magas frekvenciájú hangokra terjed ki, majd általában a hatodik évtizedben teljes sükettség alakul ki (Verstreken és mtsai, 2001). A DFNA9 jellemzője az egyensúlyérzékelő szerv (vestibulum) működési zavarából következő tünetek kialakulása: ismétlődő szédülési rohamok, súlyos egyensúly érzékelési zavar, majd esetenként teljes vestibuláris areflexia. A vestibuláris tünetek penetranciája (amely azt mutatja, hogy az adott genotípusú személyek hány százalékában jelenik meg a jellemző tünet) gyakran nem teljes, és néhány betegnél enyhe, míg másoknál súlyos egyensúly érzékelési zavar, valamint szédülési rohamok fordulnak elő (Verhagen és mtsai, 2001). A DFNA9 betegeknél a halántékcsontról metszetek hisztopatológiai vizsgálata mukopoliszacharid lerakódást mutatott ki a csigában (cochlea) elhelyezkedő Corti-szerv támasztó struktúráiban: a spirális szegélyben (továbbiakban limbusz), és a spirális szalagban, valamint a vestibuláris szövetben (Khetarpal és mtsai 1993).

### II.2.1. A *COCH* gén és fehérje terméke a cochlin

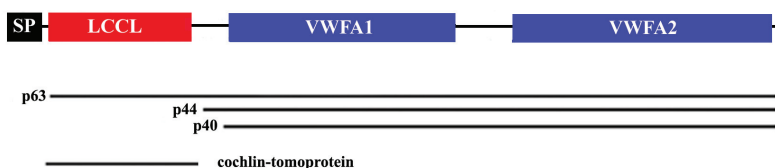
Robertson és munkatársai 1994-ben humán magzati cochleáris cDNS könyvtárból izolálták a korábban ismeretlen, Coch-5B2-nek (később *COCH*) elnevezett cDNS klónt, amelyről feltételezték, hogy új cochleáris gén. A Coch-5B2 kromoszómális lokalizációja átfedésben volt a már azonosított DFNA9 lokusszal a humán 14-es kromoszóma hosszú karjának q12-13. sávjában (Manolis és mtsai, 1996; Robertson és mtsai, 1997). Később kapcsoltsági elemzés és pozicionális génkeresési stratégiák kombinálásával három családban, ahol a DFNA9 lokuszhoz köthető a sükettség, három különböző missense mutációt találtak a

*COCH* génben (Robertson és mtsai, 1998), amelyet így a betegséget okozó génként azonosítottak.

A *COCH* génnek 12 exonja van, amely a moduláris felépítésű cochlin (korábban coch-5b2) fehérjét kódolja. A cochlin egy N-terminális szignál peptidet, egy LCCL domént, és két A típusú von Willebrand faktor domént (vWFA1 és vWFA2) tartalmaz (1.ábra).

Az LCCL domént a 4. és 5. exonok, a vWFA1 domént a 8-10. exonok, a vWFA2 domént a 11. és 12. exonok kódolják (Robertson és mtsai, 1998).

## Cochlin



**1.ábra. A humán cochlin fehérje doménszerkezete és az ismert izoformái.**

A cochlin multidomén fehérje egy szekréciós szignál peptidet (SP), egy LCCL domént és két A típusú von Willebrand faktor domént (vWFA1 és vWFA2) tartalmaz. A cochlin ismert izoformáit folytonos vonal jelöli a szekvencia megfelelő részén, méretük alapján megkülönböztetve (p40, p44, p63). A p63 a teljes hosszúságú cochlin, amely a szignál peptidet nem tartalmazza. A legrövidebb izoforma a cochlin-tomoprotein.

Különböző módszerekkel vizsgálták a *COCH* gén expresszióját. A *COCH* mRNS magas szinten expresszálódik a belső fülben és nagyon alacsony szinten az emberi lépben, kisagyban, szemben, májban, vesében, és agyvelőben (Robertson és mtsai, 2001; Li és mtsai, 2005).

A cochlin extracelluláris mátrix fehérje, amely a belső fül fehérje komponenseinek 70%-át alkotja (Ikezono és mtsai, 2001).

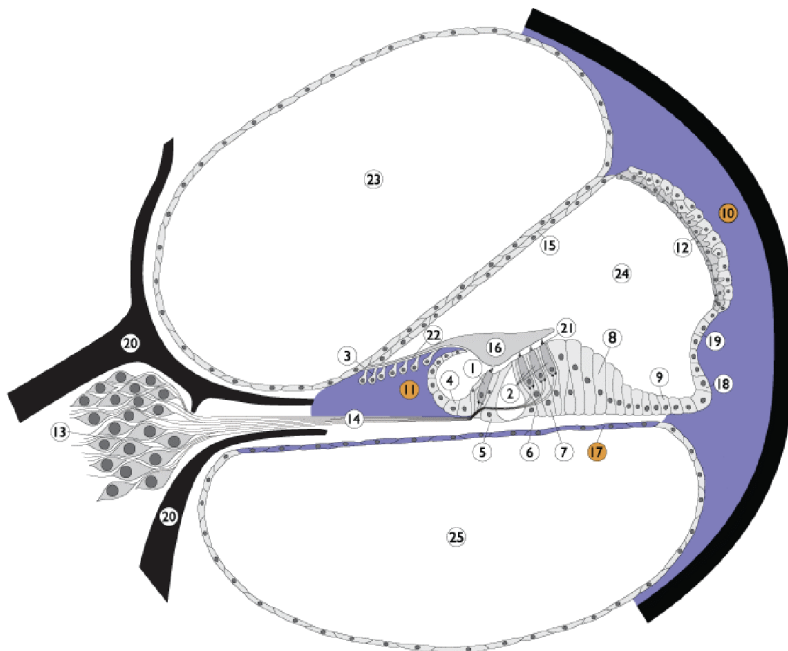
Immunológiai módszerekkel két humán cochlin izoformát (~63 kDa és ~40 kDa; Robertson és mtsai, 2001) és három marha cochlin izoformát (~63 kDa, ~44 kDa, és ~40 kDa; Ikezono és mtsai 2001) azonosítottak (1.ábra). A két kisebb méretű izoforma szekvencia analízisével kiderült, hogy mindkettőből hiányzik az LCCL domén. A 63 kDa méretű izoforma felel meg a teljes hosszúságú cochlinnak, amelyről kimutatták, hogy kizárólag a

belső fülben expresszálódik (Li és mtsai, 2005). A többi izoforma is magas szinten expresszálódik a belső fülben, illetve nagyon alacsony szinten más szövetekben is.

Ikezono és munkatársai 2004-ben azonosítottak egy olyan 16 kDa méretű cochlin izoformát (Cochlin-tomoprotein) (1. ábra), amely csak az LCCL domént tartalmazza és kizárólag a perilimfában (perilimfatikus folyadékban) található meg.

A cochlin izoformák poszttranszlációs módosításokkal, például proteolízissel, vagy alternatív splicing eredményeként jöhetnek létre, de még egyik mechanizmust sem bizonyították.

Humán vestibuláris szövetből származó cDNS-ből több splicing variánst azonosítottak, azt azonban nem bizonyították, hogy fehérje termék képződik róluk (Kommareddi és mtsai, 2007).



**2.ábra. A cochlin expressziós mintázata a belső fülben. (A cochlea keresztmetszeti ábrázolásán)**

(Hereditary Hearing Loss Homepage [http:// www.webh01.ua.ac.be/hhh/](http://www.webh01.ua.ac.be/hhh/)).

A számozott területek a cochlea megfelelő struktúráit jelölik. Az ábrán kék színnel jelölt spirális szalag, spirális szegély (limbusz) és a baziláris membrán területein expresszálódik a cochlin fehérje. (Robertson, 2001; Kommareddi, 2007)

1- Belső szőrsejt 2- Külső szőrsejt 3- Interdentális sejtek 4- Belső barázda sejtek 5-Belső támasztó sejtek 6- Külső támasztó sejtek 7-Deiters' sejtek 8-Hensen sejtek 9-Claudius sejtek **10-Spirális szalag 11-Spirális szegély (limbusz)** 12-Erezett sáv 13-Spirális ganglion 14-Hallóideg 15-Reissner's membrán 16-Tektoriális membrán **17-Baziláris membrán** 18-Külső barázda sejtek 19-Spirális kitérkedés 20-Csontos spirális lemez 21-Retikuláris lemez 22- Interdentális sejtek és tektoriális membrán közötti tér 23-Előpitvari járat 24-Középső csigajárat 25-Dobüregi járat.

A belső fülön belül a cochlin magas szinten expresszálódik a cochleában: a spirális szalag és limbusz kötőszöveti sejtjeinek területén, és a baziláris membránban (2.ábra); valamint a vesztibuláris labirintus sztrómájában (támasztó szövetében) /nincs ábrázolva/ (Robertson és mtsai 2001; Kommareddi és mtsai, 2007). A DFNA9 betegségben szenvedő

személyeknél ugyanezekben a struktúrákban mutatták ki a kötőszöveti sejtek degradációját és egy homogén, acidofil, nem-sejtes eredetű anyag lerakódását.

A cochlin fehérje fontos szerepet tölthet be a cochlea struktúrájának kialakításában, ezáltal a belső fül működésében, a hallás folyamatában.

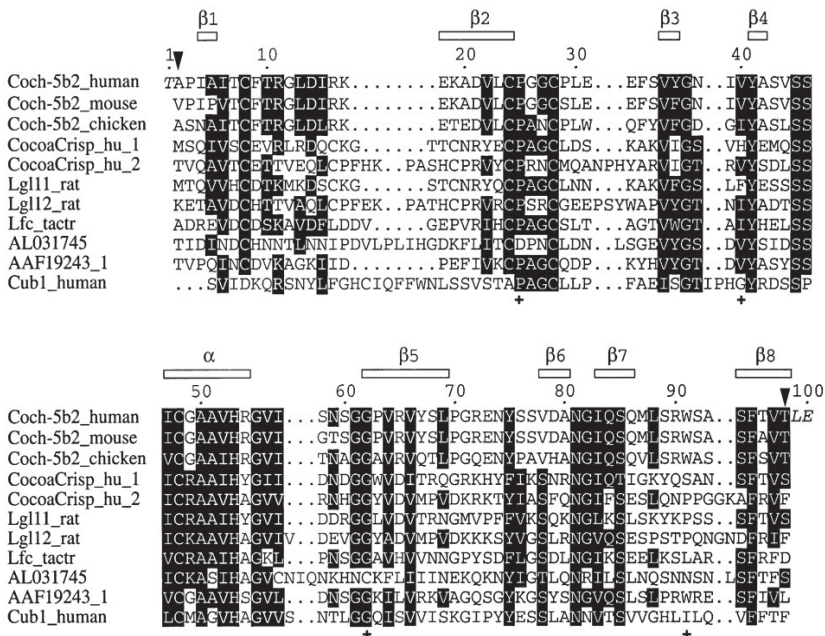
Ezt bizonyítja, hogy a cochlin fő target antigénje mind az antitest által, mind a T-sejtek által közvetített autoimmun szenzorineurális hallásvesztésnek (Boulassel és mtsai, 2001; Baek és mtsai, 2006; Tebo és mtsai, 2006).

### II.2.2. Az LCCL domének

Az LCCL domént munkacsoportunk definiálta önálló modulként, bioinformatikai módszerekkel (Trexler és mtsai, 2000). A domén megtalálható a *Limulus polyphemus* nevű ősi rákfaj C faktorában, amely a bakteriális fertőzések elleni védekező rendszer koagulációs kaszkádjának komponense; a belső fül csigájában expresszáldó cochlin fehérjében; valamint a patkány Lgl1 (late gestation lung) fehérjében, amely a magzati tüdőben expresszáldik és a tüdő fejlődésének szabályozásában vesz részt (Kaplan és mtsai, 1999). E három fehérje nevéből származik az LCCL elnevezés.

Az LCCL domént megtalálták még az ún. CocoaCrisp fehérjékben, amelyek a ciszteinben gazdag szekréciós fehérjék családjának tagjai; valamint a discoidin, CUB és LCCL doméneket tartalmazó membránfehérjékben. LCCL doméneket tartalmazó fehérjéket azonosítottak több különböző, köztük a maláriát is okozó *Plasmodium* fajban és az Apicomplexa protozoa törzs egyéb tagjaiban is. (Lasonder és mtsai, 2002; Claudianos és mtsai, 2002; Delrieu és mtsai, 2002; Dessens és mtsai, 2004). Először marha szem üvegtestéből izolálták a vitrin nevű fehérjét (Mayne és mtsai, 1999), amelynek megtalálták humán homológját (AAF19243\_1). (3.ábra)

A vitrin doménszerkezete nagyon hasonlít a cochlinéhoz, csak az LCCL domén és az első A típusú von Willebrand faktor domén közötti régió méretében különbözik.

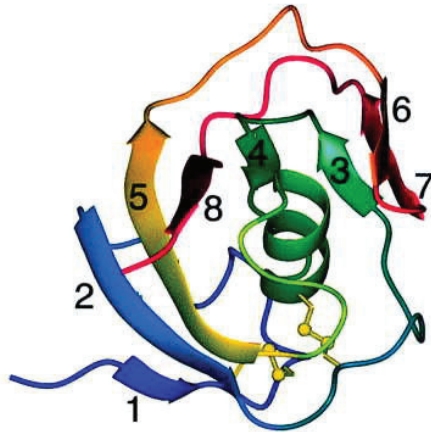


3.ábra. Az LCCL domének összehasonlító-szekvencia elemzése (Liepinsh és mtsai, 2001).

A másodlagos szerkezeti elemek sorrendben a szekvencia fölött láthatók. A legfőbb szekvencia az NMR vizsgálatokhoz használt konstrukció. A konstrukcióban az aminosavak 1-100-ig vannak számozva. A dőlt betűk az expressziós rendszerből származó aminosavakat jelölik, fekete nyilakkal az LCCL szekvenciák első és utolsó aminosavát jelölték. Az LCCL szekvenciák a következő fehérjékből származnak: a humán cochlin (Coch-5b2\_human), az egér Cochlin (Coch-5b2\_mouse), a csirke Cochlin (Coch-5b2\_chicken), a humán CocoaCrisp fehérje két LCCL doménje (CocoaCrisp\_hu\_1, és CocoaCrisp-hu\_2), a patkány Lgl1 fehérje két LCCL doménje (Lgl11\_rat, és Lgl12\_rat), a *Limulus* C faktor (Lfc\_tactr), *Plasmodium falciparum* LCCL domént tartalmazó fehérje (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AL031745), a humán vitrin (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AAF19243\_1) és a humán discoidin, CUB és LCCL domént tartalmazó fehérje (Cub1\_human). A sötétben jelölt aminosavak a szekvenciák legalább 50 százalékában konzerváltak. Azokat az aminosavakat, amelyeknek mutációi DFNA9 betegséget okoznak és a mutáns LCCL domént vizsgálták is, kereszttel jelölték.

Ismert az LCCL domén NMR szerkezete (Liepinsh és mtsai, 2001). A doménben egy központi elhelyezkedésű  $\alpha$ -hélixet a szabálytalan másodlagos szerkezetet kialakító  $\beta$ -struktúrák veszik körül. A  $\beta$ -lemezek kicsik, néhány  $\beta$ -redő igen rövid, mindössze két-három aminosavból áll. (4.ábra) A domén szerkezete nem hasonlít más, eddig ismert fehérje szerkezetekhez, tehát új típusú fehérje szerkezetről beszélhetünk.





**4.ábra. A humán cochlin fehérje LCCL doménjének NMR-szerkezete. (Liepinsh és mtsai, 2001)**

Szalag ábrázolás. A diszulfid-hidakat sárga színű gömb és pálcza jelzi. A  $\beta$ -redők a szekvenciában megadott sorrend szerint vannak feltüntetve (.3.ábra).

Az NMR vizsgálat meghatározta a diszulfid mintázatot is: a 3. ábra számozása szerint a 8. és 24., valamint a 28. és 48. ciszteinek között alakulnak ki diszulfid-hidak, amelyek az N- és C-terminálisok közel helyezkednek el, jelezve a szerkezeti stabilitás fontosságát ebben a régióban.

### **II.2.3. Az A típusú von Willebrand faktor domének**

Az A típusú von Willebrand faktor domének (vWFA) ~200 aminosavból álló homológ modulok. Számos szekretált fehérjében megtalálhatók, leginkább az extracelluláris mátrix alkotóelemeiben, de előfordulnak a hemosztázisban (pl. von Willebrand faktor), sejt adhézióban (pl. integrinek), vagy az immunitásban (pl. komplement rendszer komponensei) szerepet játszó fehérjékben is. A vWFA doméneket tartalmazó fehérjék gyakran kötődnek a doménekeken keresztül fibrilláris kollagénekhez, glikoproteinekhez és komplement komponensekhez (Colombatti és mtsai, 1991, 1993; Whittaker és mtsai, 2002).

A vWFA domének ún. Rossmann-típusú szerkezettel rendelkeznek, amelyben egy  $\beta$ -lemezt  $\alpha$ -hélixek vesznek körül (Lee és mtsai, 1995). Sok vWFA domén tartalmaz egy két-tértékű fémionokat kötő, nem folyamatos szekvencia részt, amelyet MIDAS motívumnak neveznek (Metal Ion Dependent Adhesion Site). A bivalens kationok a vWFA domént tartalmazó fehérjék egy részében részt vesznek a fehérje-fehérje interakciók kialakításában.

Az integrinek heterodimereket alkotó  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeinek összes vWFA doménjében megtalálható a MIDAS motívum. Az integrinek vWFA doménje által kötött bivalens kation és a ligand kooperatív interakciója alakítja ki az integrin-ligand komplexekre jellemző „nyitott” vWFA domén konformációt (Emsley és mtsai, 2000). Az integrinekéhez hasonló ligand kötési mechanizmust írtak le a vWFA doménnel rendelkező komplement fehérjéknél: a komplement B faktornál (Bhattacharya és mtsai, 2004) és a C2a komplement komponensnél is (Milder és mtsai, 2006).

A von Willebrand faktor multidomén fehérje három A típusú (A1-A3) doménjében is megtalálható a MIDAS motívum, mégsem kötnek fémionokat (Bienkowska és mtsai, 1997); a szerkezeti vizsgálatok alapján a ligand felismerése a domén más részét érinti és kisebb konformáció változást okoz, mint az integrineknél (Huizinga és mtsai, 2002).

Az extracelluláris mátrix fehérjék nagy családját alkotó kollagének közül 16 tartalmaz vWFA domént, amelyeken keresztül a kollagének egyéb ECM komponensekhez kötődnek (Whittaker és mtsai, 2002).

A vWFA domént tartalmazó extracelluláris mátrix fehérjék nagy csoportjába tartozik a cochlin és a vitrin. Ezen fehérjék vWFA doménjeinek funkciója nem ismert; rendelkeznek MIDAS motívummal, de a fémkötés megléte, valamint annak szerkezeti hatása nem ismert.

## II.2.4. A DFNA9 típusú hallásvesztést okozó mutációk

A *COCH* génben eddig 12 mutációt azonosítottak. A mutációk heterozigóta formában vannak jelen és a DFNA9-re jellemző, felnőttkorban megjelenő progresszív hallásvesztést és egyensúly érzékelési zavarokat okoznak (2.táblázat). A mutációk többsége az LCCL doménben lokalizálódik és sokáig csak ebben a doménben írtak le mutációkat. Először 2005-ben Street és munkatársai, majd 2008-ban Yuan és munkatársai azonosítottak három mutációt, amelyek a cochlin C-terminális A típusú von Willebrand faktor doménjét érintik (vWFA2).

Származás	Mutációt tartalmazó exon	Nukleotid változás	Aminosav	Fehérje változás	domén	Referencia
Belgium,Hollandia	4	C207T	P51S	LCCL		(de Kok, 1999; Fransen, 1999)
USA	4	T253G	V66G	LCCL		(Robertson, 1998)
Hollandia	5	G315T	G87W	LCCL		(Collin, 2006)
USA,Hollandia	5	G319A	G88E	LCCL		(Robertson, 1998; Kemperman, 2005)
Magyarország	5	367_369del	V104del	LCCL		(Nagy, 2004)
Hollandia	5	T382C	I109T	LCCL		(Pauw, 2007)
Ausztrália	5	T382A	I109 N	LCCL		(Kamarinos, 2001)
USA	5	T405C	W117R	LCCL		(Robertson, 1998)
Japán	5	G411A	A119T	LCCL		(Usami, 2003)
Kína	12	T1591C	M512T	vWFA2		(Yuan, 2008)
USA	12	G1681T	C542F	vWFA2		(Street, 2005)
Kína	12	G1681A	C542Y	vWFA2		(Yuan, 2008)

**2.táblázat.**Az ismert DFNA9 hallásvesztést okozó *COCH* gén mutációk (Robertson és mtsai, 2008).

A táblázat az eddig ismert *COCH* gén mutációkat tartalmazza, feltüntetve a mutáció származását, szekvenciában elfoglalt pozícióját, az okozott nukleotid és aminosav változást, valamint a cochlin fehérje mutáció által érintett doménjét. A referenciák az adott mutációt elsőként leíró szerzők közleményei.

A *COCH* mutációk gyakorisága nem ismert, mivel jelenleg sehol nem végeznek genetikai diagnosztikai vizsgálatot a felnőtt korban kialakult hallásvesztésben szenvedő betegeknél. A világon eddig összesen 12 *COCH* gént érintő mutációt találtak, ebből egyedül Hollandiában négy különbözőt írtak le. Ez azt valószínűsíti, hogy a *COCH* mutációk

előfordulási gyakorisága magasabb, mint ahogy a jelenlegi adatokból látszik (Robertson és mtsai, 2008).

### **II.2.5. A *COCH* mutációk hatásának vizsgálata: következtetések a DFNA9 patomechanizmusára**

Az egy évtizedet átfogó intenzív kutatómunka ellenére keveset tudunk a cochlin fehérje funkciójáról, valamint arról, hogy a mutáns cochlin fehérjék milyen mechanizmus által okoznak hallásvesztést.

A DFNA9 domináns betegség, ezért lehetséges, hogy a mutációk funkciónyeréses mechanizmus szerint fejtik ki hatásukat. Homozigóta *COCH*(-/-) mutáns egereknél, amelyek nem expresszálták a cochlint, nem mutattak ki semmilyen szignifikáns hallásvesztést, sem a DFNA9-re jellemző hisztopatológiai tünetet. Ez arra utal, hogy a DFNA9 betegséget nem a *COCH* gén elégtelen működése okozza, hanem a mutációk domináns negatív vagy funkciónyeréses hatása (Makishima és mtsai, 2005).

A DFNA9 betegek belső fülében detektált oldhatatlan, nem-sejtes eredetű lerakódás (Khetarpal és mtsai, 2000) a mutáns cochlin fehérjék káros, új funkciójának következménye lehet. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy egy P51S mutációt hordozó, DFNA9 betegségben szenvedő személy halántékcsontról metszeteinek immunhisztokémiai vizsgálataival kimutatták a cochlin fehérje jelenlétét a jellegzetes nem-sejtes eredetű lerakódásokban, a cochlea és vestibulum mezodermális struktúráiban (Robertson és mtsai, 2006).

A DFNA9-et okozó mutációk többsége a cochlin LCCL doménjét érinti (sokáig kizárólag ebben a doménben azonosítottak mutációkat) (5.ábra), amely fontos szerepet tölthet be a hallásvesztés kialakulásában.



**5. ábra. A cochlin doménszerkezete és a DFNA9 betegséget okozó *COCH* mutációk elhelyezkedése**

A DFNA9 típusú hallásvesztést okozó mutációk közül kilenc a cochlin LCCL doménjében lokalizálódik, három a C-terminális A típusú von Willebrand faktor doménben (vWFA2) található.

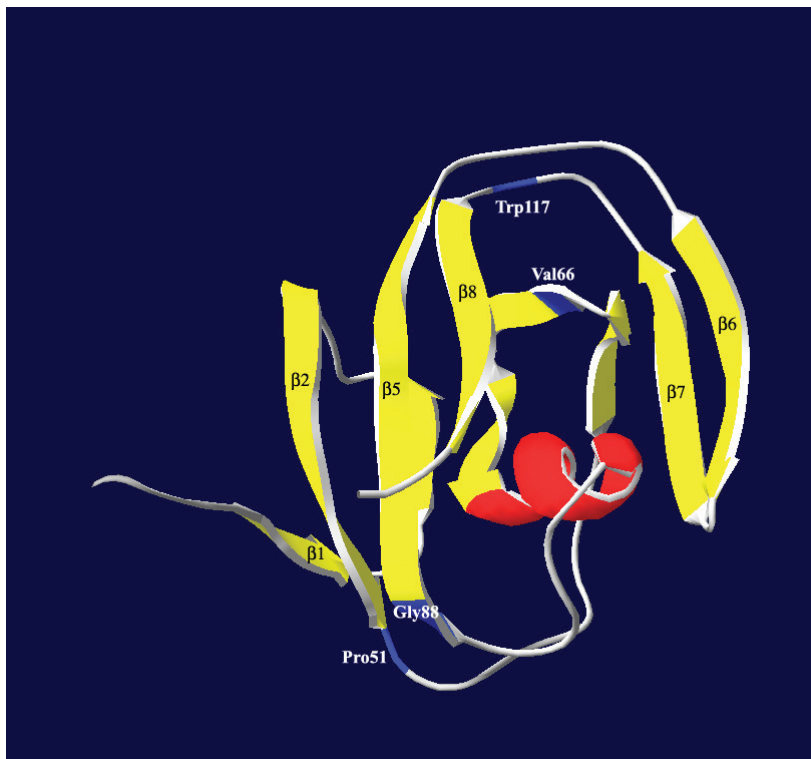
Az LCCL domént érintő mutációk doménszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálatához bakteriális rendszerben expresszálták a P51S, V66G, G88E, és W117R mutáns LCCL doméneket. Ezek a mutációk a másodlagos szerkezeti elemeket kialakító konzervatív aminosavakat érintik (3.ábra; kereszttel jelölt aminosavak ), így megváltoztatásuk a domén szerkezetének kialakulását és stabilitását befolyásolhatja (Liepinsh és mtsai, 2001).

A P51S, V66G, G88E mutánsok, a vad típusú LCCL doménnel ellentétben, a feltekeredés során oldhatatlan aggregátumot képeztek, tehát nem alakult ki a natív fehérjére jellemző szerkezet. A szerkezeti vizsgálatokból kiderült, hogy a P51S, V66G, G88E mutációk a  $\beta$ -struktúrákat érintik, ezért befolyásolhatják a szerkezet kialakulását és stabilitását (6.ábra). Ezek a mutációk eredményezhetik a cochlin fehérjék felhalmozódását. A hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérjék lassú aggregálódása a cochleáris és vestibuláris szövetekben a neuronok degenerációját okozhatja, amely progresszív hallásvesztést és egyensúly érzékelési zavarokat eredményez (Trexler és mtsai, 2000).

A W117R mutáns LCCL domén a vad típusúhoz hasonló szerkezettel rendelkezik; CD spektroszkópiás és kalorimetriás vizsgálatok is a vad típusú LCCL doménre jellemző spektrumokat eredményeztek (Liepinsh és mtsai, 2001).

A 117. triptofán, amelynek mutációja nincs hatással a szerkezet kialakulására, az LCCL domén oldószernél kitett felszínén helyezkedik el (6.ábra) és általában nem konzervált az LCCL doménekben, csak a cochlin fehérjékben (3.ábra.). Feltételezhető, hogy valamilyen fehérjével való kölcsönhatásban vesz részt. (Liepinsh és mtsai, 2001).

A W117R mutáns cochlin fehérjék esetében a normális szerkezetű fehérjékkel szembeni domináns negatív hatás lehetséges magyarázata az, hogy a mutációk gátolják a kölcsönhatások kialakítását a cochlea extracelluláris mátrixának komponenseivel, és ezáltal a cochlin mátrixba való integrációját.



**6.ábra.** A vizsgált, mutációval érintett aminosavak elhelyezkedése a humán cochlin LCCL doménjének szerkezetében.

Az LCCL domén koordinátái (1JBI) a PDB (Protein Data Bank) adatbázisból származnak. A sárga színnel jelölt  $\beta$ -redők számozása a 3.ábrán leírt sorrend szerint történt. Az  $\alpha$ -hélixet piros szín jelöli. A kék színű sávok jelölik azokat az aminosavakat, amelyeknek mutációi DFNA9 típusú hallásvesztést okoznak és bakteriális expressziós rendszerben vizsgálták a mutációk doménszerkezetre gyakorolt hatását.

Robertson és munkatársai (2003) emlős sejtekben expresszálták a P51S, V66G és G88E mutáns cochlin fehérjéket azért, hogy megvizsgálják vajon ezek az LCCL doménben

lokalizálódó mutációk befolyásolják-e a teljes cochlin fehérje szintézisét, szekrécióját és a poszttranszlációs működését. Eredményeik szerint a mutáns cochlin fehérjék szekréciója és poszt-transzlációs érése nem tér el a vad típusú fehérjétől, tehát a mutáns fehérjék nem érzékenyek a sejtekben működő minőségi kontroll mechanizmusokra. A bakteriális rendszerben expresszált mutáns LCCL doménekkel ellentétben nem tapasztaltak a hibás szerkezetű fehérjékre jellemző extracelluláris cochlin aggregációt. Valószínűleg emlős sejtekben a mutáns cochlin fehérjék könnyebben kialakítják a natív fehérjére jellemző szerkezetet az endoplazmatikus retikulumban jelen lévő speciális redox környezet és a fehérjék feltekeredését elősegítő mechanizmusok jelenléte miatt. Mindezek ellenére *in vivo*, a mutáns cochlin fehérjék évek alatt, lassan aggregálódhatnak, amelynek kumulatív káros hatásai lehetnek.

Az előbbi vizsgálatokkal párhuzamosan, Grabski és munkatársai (2003) is expresszálták a P51S, V66G, G88E, I109N és W117R mutáns cochlin fehérjéket humán HeLa sejtekben. Eredményeik részben megegyeznek a fent leírtakkal: a mutációk nem érintik a cochlin fehérje szintézisét és szekrécióját. Ebben a tanulmányban azonban immunfluoreszcens vizsgálatokkal kimutatták, hogy a vad típusú és a mutáns cochlin fehérjék extracelluláris lokalizációja különbözik. A W117R és a P51S mutáns cochlin fehérjék a vad típusú cochlinhoz hasonlóan beépültek az extracelluláris mátrixba, míg a V66G, G88E és I109N mutánsok esetében ez nem történt meg. Eredményeik alapján az LCCL doménnek többféle funkciója lehetséges: egyrészt közvetíti a cochlin extracelluláris mátrixba való integrálódását, ezen folyamatot gátolhatja a V66G, G88E és I109N mutáció; másrészt az LCCL domén egyéb ECM komponensekhez kötődhet, amelyet a W117R és P51S mutációk gátolhatnak.

A cochlin extracelluláris mátrixba való integrációjának, vagy a mátrix komponensekkel kialakított kapcsolatának megváltozása kétféle molekuláris mechanizmus jelenlétére utal, amely a DFNA9 betegség kialakulásához vezethet.

Az első olyan mutációt, amely nem a cochlin LCCL doménjében lokalizálódik, Street és munkatársai írták le 2005-ben. A heterozigóta formában megjelenő mutáció a C542F aminosavcserét eredményezte a cochlin C terminális A típusú von Willebrand faktor doménjében (vWFA2)(5.ábra).

A C542F mutáns cochlin fehérjét emlős sejtekben expresszálták és a korábban expresszált cochlin mutánsokkal egyezően szekréciója normális volt. A mutációnak a diszulfid kötés kialakulására gyakorolt hatását vizsgálva kimutatták, hogy a C542F mutáns

nem-redukáló körülmények között lassabban halad a gélben, mint a vad típusú, vagy a G88E, illetve P51S mutáns cochlin fehérjék; míg redukáló körülmények között nincs ilyen különbség. A multidomén von Willebrand faktor fehérje A doménjeinek analógiája alapján a feltételezett intramolekuláris C362-C542 diszulfid-kötés nem alakul ki a mutáns cochlin C-terminális vWFA doménjében. A diszulfid-kötés hiánya a mutáns cochlin fehérjékben destabilizálhatja a vWFA2 domént és egy ciszteint párosítatlanul hagy a 362. pozícióban. A párosítatlanul maradó cisztein miatt intermolekuláris diszulfid kötések alakulhatnak ki a cochlin fehérjék között, vagy a cochlin és más extracelluláris mátrix fehérjék között. Tehát a mutációk szerkezeti és funkcionális változásokat okozhatnak a cochlin fehérjében.

Nemrégiben további két *COCH* gén mutációt azonosítottak, amelyek a cochlin C-terminális von Willebrand faktor doménjében a C542Y és M512T aminosav cserét okozzák (Yuan és mtsai, 2008). E mutációk cochlin fehérjére gyakorolt hatását még nem vizsgálták, a C542Y mutáció esetében szintén az intramolekuláris diszulfid kötés hiánya okozhatja a cochlin fehérjében történt változásokat.

## **II.2.6. A cochlin és egyéb extracelluláris mátrix komponensek kölcsönhatásai**

A cochlinnal kölcsönhatást kialakító lehetséges extracelluláris mátrix fehérjékről leginkább a szövettani vizsgálatok szolgáltatnak információt. A DFNA9 betegek halántékcsonst metszeteinek vizsgálatai kimutatták, hogy a II. típusú kollagén jellemző felépítésű kötegei, amelyek az egészséges személyeknél detektálhatóak, a betegeknél hiányoznak (Khetarpal és mtsai, 2000).

Patkányokkal végzett immunhisztokémiai vizsgálatok során az egyensúlyérzékelő szerv II. típusú kollagénben gazdag területein a cochlinra nézve immunreaktivitást tapasztaltak (Ikezono és mtsai, 2005). Ezen kívül ismert, hogy a II. típusú kollagén is a belső fül szubepitéliális kötőszövetének és extracelluláris mátrixának nem-sejtes alkotórésze (Slepecky és mtsai, 1992).

A cochlin és a II. típusú kollagén morfológiai kapcsolatát patkány félkörös ívjáratának (az egyensúlyérzékelő szerv része) immun-elektronmikroszkópos analízisével mutatták ki: a cochlin és a II. kollagén ugyanabban a fibrilláris struktúrában található a szubepitéliális területeken (Mizuta és mtsai, 2008). Mindezek alapján feltételezték, hogy a cochlin



kölcsönhatásba léphet a II. típusú kollagén kötegekkel, amely szerepet játszhat a belső fül szerkezeti homeosztázisának fenntartásában (Khetarpal, 2000; Mizuta és mtsai, 2008 ).

### II.2.7. A DFNA9 állatmodellje

A DFNA9 betegség kései kezdete, valamint progresszív jellege miatt feltételezhető, hogy a mutáns cochlin hatásai: az aggregáció, vagy az extracelluláris mátrix komponensekkel való kölcsönhatások kialakításának megváltozása kumulatív folyamatok. Ennek vizsgálatát tűzték ki célul Robertson és munkatársai (2008), egy DFNA9 betegséget megfelelően modellező „knock-in” mutáns egér törzs létrehozásával. Mivel az ismert *COCH* mutációk egyike sem vezet korai fehérje terminációhoz és csökkent működésű fehérjéhez, egy célzott missense mutációt hoztak létre a null mutáns helyett. A létrehozott mutáció az LCCL doménben található G88E mutáció volt.

A mutáns *COCH*<sup>G88E/G88E</sup> átírat sikeres transzlációját immunhisztokémiai vizsgálatokkal ellenőrizték. A teljes belső fülre kiterjedő funkcionális vizsgálatokat végeztek 11-21 hónapos egerekkel, amelyeknél nem egy időben bekövetkező, elégtelen cochleáris és vesztibuláris működést tapasztaltak. A teljes hallásvesztés 21 hónapos korra tehető. A hallásvesztés az egéرنél is felnőtt korban alakul ki, csak úgy, mint az embernél.

Fontos hisztopatológiai megfigyelés, hogy az egér modellnél nem mutatható ki a DFNA9-re jellemző eozinofil lerakódás, jelezve, hogy nincs látható cochlin aggregáció. Lehetséges, hogy a mikrofibrilláris lerakódások még nem alakultak ki annyira, hogy detektálhatóak legyenek. Az is lehetséges, hogy az egéرنél a hisztopatológiai tünetek kifejeződése az emberétől különbözik, ahol a jellegzetes lerakódásokat a DFNA9 végső stádiumában figyelték meg.

Tény, hogy idáig ez az egyetlen egér modell, ahol a hallásvesztés ilyen kései életkorban kezdődik, ezért lehetőséget ad mind a progresszív hallásvesztés, mind a terápiás lehetőségek tanulmányozására.

### III. Célkitűzések

1. A DFNA9 típusú hallásvesztés kialakulásáért a cochlin fehérjét kódoló *COCH* génben bekövetkező mutációk felelősek. A betegség előfordulási gyakorisága nem ismert, mivel eddig még nagyon kevés mutációt azonosítottak a világ különböző részein. Mivel a mutációk hatásának ismerete segítséget nyújthat a betegség patomechanizmusának felderítésében, ezért munkám első részében célul tűztem ki további mutációk keresését a magyar populációban, elsősorban a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában. Az LCCL doménben lokalizálódik az eddig azonosított mutációk nagy része, ezért e domén kulcsszerepet játszhat a hallásvesztés kialakulásában. Az új mutáció, vagy mutációk azonosítása mellett a mutáns fehérjék rekombináns úton történő előállítását és hatásának vizsgálatát tűztem ki célul.

2. A *COCH* gén által kódolt cochlin fehérje funkciójáról, a hallás folyamatában betöltött szerepéről máig nincsenek pontos ismereteink. A cochlin a belső fül extracelluláris mátrixának fő alkotóelemeként igen fontos szerepet tölthet be a bonyolult szerkezetű cochlea jellegzetes architektúrájának kialakításában. Ennek alapja a cochlin mátrixba való integrációja, különböző mátrix komponensekkel kialakított kölcsönhatásokon keresztül. Munkám további céljai között szerepelt a cochlin különböző doménjeinek előállítása és az extracelluláris mátrix komponensekkel kialakított kölcsönhatásának vizsgálata, kinetikai paramétereinek meghatározása.

## IV. Anyagok és módszerek

### IV.1. Genetikai analízis

#### IV.1.1. Beteganyag

A Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Fül-Orr-Gégészeti, Fej- és Nyaksebészeti Klinikáján dr. Horváth Miklós adjunktus segítségével a cochleáris implantációs listáról választottam ki azokat a betegeket, akik megfeleltek a DFNA9 diagnosztikai kritériumainak (OMIM #603196): 20 és 56 év közötti életkorban megjelenő progresszív hallásvesztés és vestibuláris tünetek; valamint a lehetséges családi előfordulás. Audiometriás dokumentáció alapján, a kiválasztott betegeknél a halláskárosodás először a magas frekvenciákat érintette, majd lassan áterjedt az alacsonyabb frekvencia tartományba, végül teljes hallásvesztés alakult ki. A betegek többségénél szédülésszerű tünetek is megjelentek.

A genetikai analízishez 14 különböző családból 17 érintett személy DNS mintáját használtam fel, 50 egészséges kontroll személy DNS mintájával összevetve (publikált adatok).

További 12 halláskárosodott családból 13 személy DNS vizsgálatát is elvégeztem.

#### IV.1.2. Genomiális DNS izolálás

Perifériás vérésejtekből izoláltam genomiális DNS-t a Puregene DNS izoláló kit felhasználásával. (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)

Az izolált DNS minta koncentrációjának meghatározásához spektrofotométerrel mértem a hígított DNS oldat abszorbanciáját 260 illetve 280 nm hullámhosszon. A kapott értékekből számítottam a DNS koncentrációját a következő képlet felhasználásával:

$$[\text{DNS}] = F \times A_{260} / E \times l,$$

F, a hígítás foka;  $A_{260}$ , a 260 nm-en mért abszorbancia; E, a moláris extinkciós koefficiens (25,5); l, a küvetta rétegvastagsága (1cm).

A DNS oldat tisztaságának (fehérje és RNS mentességének) megállapításához az  $A_{260}/A_{280}$  arányt vettem figyelembe.

#### IV.1.3. Mutációk keresése és azonosítása a *COCH* génben (NM 004086)

A *COCH* gén 4. és 5. exonjának amplifikálásával az LCCL domént kódoló régióban végeztem mutáció analízist. Az 5'-CCACTATGCCCAAGAAGTCCTAAGAATGC-3'sense és 5'-GGGTGGGAGAATATTACAGAATGAGAAC-3'antisense intronikus PCR primerekkel amplifikáltam a 4. exont, 4. intront és az 5. exont közrefogó genomiális régiót. A PCR reakció körülményei: 95 °C 2 perc denaturáció, majd 35 ciklus 94 °C 2 perc, 65 °C 30 mp, 68 °C 2 perc. Az amplifikált PCR termékek tisztításához NucleoSpin Extract Kitet (Macherey-Nagel Gmb, Düren, Németország) használtam.

Dideoxi szekvenálással (Sambrook, Fritsch és Maniatis: Molecular cloning, 1989) határoztam meg a 4. és 5. exonok szekvenciáját, a 4. exont szegélyező 5'-CGTCTGCATTTCTCTCCACCCTGGTG-3' és az 5. exont szegélyező 5'-TGAAAAAGTGTGGATAGCATCTCAGCTGC-3' primerekkel. (A mintákat LKB Macrophor elektroforézis készülékkel, denaturáló poliakrilamid gélen futtattam meg és autoradiográfiával értékeltem ki.)

Az 5. exonjában mutációt hordozó beteg személynél a mutáció meglétének igazolásához amplifikáltam az érintett 5. exont az 5'-CTGAAAAAGTGTGGATAGCATCTCAGCTGC-3' sense és 5'-GGGTGGGAGAATATTACAGAATGAGAAC-3' antisense PCR primerekkel. A PCR terméket tompa végű ligálással beépítettem *Sma*I restriktions enzimmel emésztett M13mp19 Rf vektorba. A mutáns és vad típusú alléleket hordozó fágokat megszekvenáltam.

A restriktions enzimek és a klónozott DNS dideoxi szekvenálásához felhasznált M13 szekvenáló kit a Biolabs-tól származott (Beverly, MA, USA). A fágok szaporításához a JM-109 *Escherichia coli* baktérium törzset használtam.

Egy mutáns és egy vad típusú allélt hordozó fág klónból dupla szálú DNS-t létrehozva, a szekvenciát meghatároztuk ABI PRISM 3100 típusú automata szekvenátorral is.

## IV.2. Rekombináns fehérje konstrukciók előállítás

Az összes felhasznált restrikciós enzimet a New England Biolabs (Beverly, MA, USA) és a Promega (Madison, WI, USA) cégektől vásároltuk. A PCR reakciókhoz használt oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, IA, USA) szintetizálta.

### IV.2.1. A rekombináns V104del mutációt tartalmazó LCCL domén bakteriális expressziója

A V104del mutációt tartalmazó LCCL domént kódoló DNS szakaszt „két lépéses” PCR technikával hoztam létre. Először külön amplifikáltam a *COCH* gén 4. exonját és a mutáns 5. exont az alábbi primerekkel:

4. exon

5'-GCGGGATCCGTCGACCGCTCCCATTGCTATCACATG-3' (sense) és

5'-GAGTTGCTGATTACTCCCCTGTGGACAGCAGCCCCA-3' (antisense);

5. exon

5'-TGGGGCTGCTGTCCACAGGGGAGTAATCAGCAACTC-3' (sense) és

5'-GCGAAGCTTACTCGAGAGTTACTGTGAAAGAAGCAG-3' (antisense)

A 4. exon amplifikálásához a beteg személy genomális DNS-ét használtam templátként, míg a mutáns 5. exon amplifikálásához a mutáns allélt tartalmazó M13mp19 klónt. A két cDNS fragmentumot egy második PCR reakcióval kapcsoltam össze az 5'-GCGGGATCCGTCGACCGCTCCCATTGCTATCACATG-3' (sense) és 5'-GCGAAGCTTACTCGAGAGTTACTGTGAAAGAAGCAG-3' (antisense) primerekkel.

Az amplifikált DNS-t *HincII* és *HindIII* restrikciós enzimekkel emésztettem és *PvuII/HindIII* enzimekkel emésztett pMed23 expressziós vektorba ligáltam. A pMed23 expressziós plazmidot (Lukachovich és mtsai, 1987) Venetiánér Páltól kaptuk (MTA Szegedi Biológiai Központ). Ez a konstrukció egy fúziós fehérjét kódol, amelyben a  $\beta$ -galaktozidáz első 35 aminosava kapcsolódik a mutáns LCCL doménhez. A plazmid előállításához és a fehérje expresszióhoz az *E. coli* JM-109 baktériumtörzset használtam.

A V104del mutáns LCCL domén expressziójánál és refoldáltatásánál ugyanazt a protokollt követtem, amit a vad típusú LCCL domén és egyéb mutáns LCCL domének előállításánál (Trexler és mtsai, 2000; Liepinsh és mtsai, 2001) leírtak: a rekombináns fehérje

expresszióját 100 $\mu$ M IPTG-vel (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid) indukáltam. A fehérjét tartalmazó inklúziós testet feloldottam 0,1 M Tris-HCl, 8 M urea, 10 mM EDTA és 0,1 M dithiothreitol, pH 8.0 oldatban. Az oldatot 25 °C-on 60 percig inkubáltam állandó keverés mellett. Az oldhatatlan sejttermelékét centrifugálással eltávolítottam és a feloldott fehérjét 100 mM Tris-HCl, 8 M urea, 10 mM EDTA, 0,1% 2-mercaptoetanollal ekvilibrált Sephacryl S-300 oszlopon tisztítottam. A rekombináns fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttem és refoldáltattam 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 pufferrel szemben, 25 °C-on dializálva.

#### **IV.2.2. Az I109N mutációt tartalmazó LCCL domén bakteriális expressziója**

Az I109N mutációt hordozó DNS szakaszt „két lépéses” PCR technikával hoztam létre. Először a két, mutációt hordozó átfedő DNS fragmentumot hoztam létre két PCR reakcióban; az LCCL domén 5’ illetve 3’ végével komplementer primerekkel párosítva két mutagenézis primert: 5’-GCGGGATCCGTCGACCGCTCCCATGCTATCACATG-3’ sense (LCCL 5’ primer) és 5’-GAGACTGGTTGCCATTGGC-3’ antisense mutagenézis primer, valamint az 5’-GCCAATGGCAACCAGTCTC-3’ sense mutagenézis primer és 5’-GCGAAGCTTACTCGAGAGTTACTGTGAAAGAAGCAG-3’ antisense (LCCL 3’ primer). Templátként a korábban leírt pMed23/LCCL klónt használtam (Trexler és mtsai 2000). A második PCR reakcióban összekapcsoltam a két átfedő cDNS fragmentumot az LCCL 5’ és 3’ primerekkel. A PCR terméket *Bam*HI és *Hind*III enzimekkel emésztettem és ugyanezekkel az enzimekkel emésztett M13mp19 vektorba ligáltam. A klónozott DNS szekvenciáját dideoxi szekvenálással ellenőriztem.

A mutáns klónból származó inszertumot *Hinc*II/*Hind*III emésztéssel kivágtam az M13mp19 vektorból és *Pvu*II/*Hind*III enzimekkel emésztett pMed23 expressziós vektorba ligáltam.

A továbbiakban a V104del mutáns LCCL domén expressziójánál leírt protokollt követtem.

### IV.2.3. A vad típusú LCCL domén és az I109N mutáns LCCL domén expressziója *Pichia pastoris*ban

Az N-glikoziláció vizsgálatához mind a vad típusú, mind az I109N mutáns LCCL domént expresszáltam metilotróf élesztőben, *Pichia pastoris*ban, az Easy Select *P. pastoris* expressziós kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) pPICZαA expressziós vektorát felhasználva.

A vad típusú LCCL doménnek megfelelő inszertumot a korábban elkészített M13mp18/LCCL konstrukcióból (Trexler és mtsai, 2000); az I109N mutációt tartalmazó inszertumot a fent leírt M13mp19 vektorba ligált konstrukcióból *HincII/XhoI* enzimekkel emésztve vágtam ki és ligáltam *EcoRI* enzimmel emésztett, majd *Klenow* polimerázzal feltöltött, ezután *Sall* enzimmel emésztett pPICZαA expressziós vektorba. A klónozott DNS szekvenciáját minden esetben dideoxi szekvenálással ellenőriztem.

Az expressziós vektorban a vad típusú és mutáns LCCL domének az élesztő α-párosodási faktor szekréciós szignál szekvenciájával fúzionáltak, ami lehetővé teszi a rekombináns fehérjék kiválasztását a táptalajba.

A pPICZαA/LCCL és pPICZαA/LCCL\_I109N expressziós plazmidok zeocin rezisztencia gént tartalmaznak, amely lehetővé teszi a pozitív klónok kiválasztását. A rekombináns fehérjék expressziója a *Pichia pastoris* alkohol oxidáz 1 gén indukálható P<sub>AOX1</sub> promoterének szabályozása alatt áll. A domének 3' végén a szekvenciával azonos leolvasási keretben hexahistidin (His)-tag található.

*Pichia pastoris* GS115 (his4) törzset transzformáltam a pPICZαA/LCCL és pPICZαA/LCCL\_I109N vektorral, majd a pozitív transzformánsokat zeocint tartalmazó YPDS lemezekén (1% élesztő kivonat, 2% pepton, 2% dextróz, 1 M szorbitol és 100 µg/ml zeocin) szelektáltam, az Invitrogen Expression System használati utasítása szerint (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

A zeocin rezisztens kolóniákból genomális DNS-t preparáltam, azért, hogy ellenőrizzem az expressziós plazmidok élesztő kromoszómába való integrációját.

A vad típusú és az I109N mutáns LCCL domén megfelelő *Pichia pastoris* klónjait 400 ml, 2% pepton, 1% élesztő kivonat és 5% glicerolt tartalmazó táptalajban 72 órán át 28 °C-on növesztettem, majd a táptalajt lecseréltem 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5), 0,2% ammonium szulfát, 0,34% élesztő nitrogén bázis, 0,004% hisztidin és 0,00004% biotint tartalmazó

táptalajra és 48 órán át rázattam. A fehérje termelést napi 1% metanol hozzáadásával indukáltam.

A sejteket centrifugáltam, majd a felülúszót felvittem nikkel-affinitás oszlopra. A nem kötött komponenseket 10 oszloptérfogat 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 7.9 pufferrel eltávolítottam. A kötött rekombináns fehérjét 20 mM Tris, 300 mM imidazol, pH 7.9 elúciós pufferrel eluáltam az oszlopról.

Bár az I109N mutáns LCCL domén esetében a PCR technikával ellenőrzött klónok az élesztőbe való integrációt mutatták, egyik *Pichia pastoris* klón sem termelt detektálható mennyiségű fehérjét.

A vad típusú, izolált fehérjét liofilizáltam, majd sómentesítettem 0,1 M ammonium-bikarbonáttal (pH 8.0) ekvibrált Sephadex G-25 oszlopon. A fehérjét tovább tisztítottam 0,1 M ammonium-bikarbonáttal (pH 8.0) ekvibrált Sephadex G-75 oszlopon. A tiszta LCCL domént tartalmazó frakciókat egyesítettem és liofilizáltam.

#### **IV.2.4. A humán cochlin második A típusú von Willebrand faktor (coch/vWFA2) doménjének expressziója és tisztítása**

A humán coch/vWFA2 domént a metilotróf élesztőben, *Pichia pastoris*ban expresszáltam, az Easy Select *P. pastoris* expressziós kit pPICZαA expressziós vektorát felhasználva.

A coch/vWFA2 domént kódoló DNS szakaszt az 5'-GCGAGAATTCAGCAAGACCTGTTATAACTCA-3' sense és 5'-GCGGCATGCCTCGAGTTGCTGGGATTCTAAGAAATC-3' antisense primerekkel amplifikáltam humán hasnyálmirigy cDNS könyvtárból (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA). Az amplifikált DNS-t *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel emésztettem, majd ligáltam *EcoRI* és *Sall* enzimekkel emésztett pPICZαA expressziós vektorba. A klónozott DNS szekvenciáját dideoxi szekvenálással ellenőriztem. Az expressziós konstrukció az LCCL doménnél leírtakkal egyezik.

*Pichia pastoris* GS115 (his4) törzset transzformáltam a pPICZαA/vWFA2 vektorral, majd a pozitív transzformánsokat zeocint tartalmazó YPDS lemezekon szelektáltam. A zeocin rezisztens kolóniákból genomális DNS-t preparáltam, hogy ellenőrizzem az expressziós plazmid élesztő kromoszómába való integrációját.



A megfelelő *Pichia pastoris* klónokat az LCCL doménnél leírt módon növesztettem és indukáltam a fehérje expressziót. A sejteket centrifugáltam, majd a felülúszót felvittem nikkel-affinitás oszlopra. Az LCCL doménnél leírt módon izoláltam és sómentesítettem a fehérjét, amelyet ezután tovább tisztítottam 0,1 M ammonium-bikarbonáttal (pH 8.0) ekvibrált Sephacryl-S300 oszlopon. A tiszta coch/vWFA2 fehérjét tartalmazó frakciókat egyesítettem és liofilizáltam.

#### **IV.2.5. A humán cochlin első A típusú von Willebrand faktor (coch/vWFA1) doménjének expressziója**

A humán coch/vWFA1 domént a metilotróf élesztőben, *Pichia pastoris*ban expresszáltam, az Easy Select *P. pastoris* expressziós kit pPICZαA expressziós vektorát felhasználva.

A coch/vWFA1 domént kódoló DNS szakaszt az 5'-GCGAGAATTCAGTGGCAATAAAGATTGTAAA-3' sense és 5'-GCGACTCGAGCAGAGGCTTTACGTATTTGT-3' antisense primerekkel amplifikáltam humán hasnyálmirigy cDNS könyvtárból. Az amplifikált DNS-t *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel emésztettem, majd ligáltam *EcoRI* és *Sall* enzimekkel emésztett pPICZαA expressziós vektorba. A klónozott DNS szekvenciáját dideoxi szekvenálással ellenőriztem.

*Pichia pastoris* GS115 (his4) törzset transzformáltam a pPICZαA/vWFA1 vektorral, majd a pozitív transzformánsokat zeocint tartalmazó YPDS plate-ken szelektáltam. A zeocin rezisztens kolóniákból genomális DNS-t preparáltam, hogy ellenőrizsem az expressziós plazmid élesztő kromoszómába való integrációját.

Bár a PCR technikával ellenőrzött klónok az élesztőbe való integrációt mutatták, egyik *Pichia pastoris* klón sem termelt detektálható mennyiségű coch/vWFA1 fehérjét.

### **IV.3. Fehérje elemzések**

A fehérje minták összetételét nátrium dodecil-szulfát/poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS/PAGE) elemeztem, 11-22 %-os lineáris poliakrilamid gradiens gélek használatával, redukáló és nem-redukáló körülmények között. (Laemmli és mtsai, 1970). A géleket Coomassie brilliant Blue G-250 festékkel festettem.

A rekombináns fehérjék koncentrációját spektrofotometriásan határoztam meg a következő extinkciós koefficienseket használva: coch/LCCL,  $10930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Trexler és mtsai 2000); coch/vWFA2,  $13075 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Az extinkciós koefficienseket a ProtParam online fehérjeelemző programmal <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) határoztam meg. Az N-terminális szekvenálást egy Applied Biosystems 471A fehérje szekvenáló készülékkel, online ABI 120 A phenylthiohydantoin (PHT) elemzővel végeztük.

## **IV.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia**

A coch/vWFA2 domén szerkezetét CD spektroszkópiával vizsgáltam. A távoli ultraibolya tartományban felvett CD spektrumból a fehérjében található másodlagos szerkezeti elemek arányára lehet következtetni.

A CD spektrumokat 195-250 nm közötti hullámhossz tartományban vettem fel, JASCO J-720 spekropolariméterrel, a termosztáláshoz Neslab RTE-111 vízfürdőt használva. A mérések 0,2 mg/ml koncentrációjú fehérje oldattal, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) pufférben, 1 mm úthosszúságú termosztálható küvettában, 25 °C-on végeztem.

További mérési paraméterek: 8 sec időállandó, 20 nm/perc spektrumfelvételi sebesség, 1,0 nm résszélesség. Minden spektrum 3 független mérés átlaga. A rekombináns fehérje másodlagos szerkezetét a CD spektrumok alapján a CDPro szoftverrel határoztam meg: (<http://lamar.Colostate.EDU/~sreeram/CDPro/index.html>) (Sreerama és mtsai, 1999, 2001; Sreerama és Woody, 2000).

A rekombináns fehérje CD spektrumait 25-85 °C közötti tartományban különböző hőmérsékleteken, 10 fokként vettem fel. 222 nm-en, ahol a különböző hőmérsékleteken felvett spektrumok különbsége a legnagyobb, követtem a fehérje hődenaturációját 25-85 °C közötti tartományban, 50 °C/óra fűtési sebességgel. Az olvadási hőmérsékletet a görbék elsőrendű deriváltjaiból határoztam meg, a spektopolariméter spektrum analízis programjával.

## **IV.5. Szekvencia elemzések**

A humán cochlin (Coch\_human, NP\_004077), az egér cochlin (Coch\_mouse, NP\_031754), a csirke cochlin (Coch\_chicken, NF\_990268) fehérjék LCCL doménjének aminosav szekvenciáit az NCBI fehérje adatbázisából vettem.

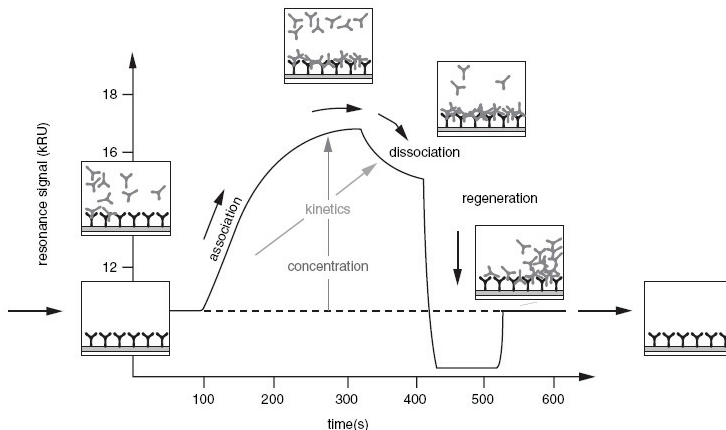
Az aminosav-szekvenciák illesztéséhez a CLUSTAL W programot használtam (Thompson és mtsai, 1994).

A konzervatív régiók ábrázolásához a Boxshade algoritmust használtam ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

## **IV.6. Fehérje kölcsönhatások vizsgálata**

### **IV.6.1. Felületi plazmon rezonancia (Surface Plasmon Resonance/SPR) analízis**

Molekuláris interakciók detektálására alkalmas a felületi plazmon rezonancia analízis (SPR), amellyel egy fémfelület közelében bekövetkező törésmutató változás mérhető. Az egyik kölcsönható partnert egy szenzor chip felszínére kötik (ligand), míg a másik partnert tartalmazó oldatot (analit) konstans áramlási sebességgel a felszínre injektálják. A molekulák közötti asszociáció és disszociáció következményeként a felszínen változik a koncentráció, amely a törésmutatót befolyásolja és SPR válaszként detektálható. A létrejövő SPR jel időbeli változása folyamatosan követhető a szenzorgramon, ami a molekulák közötti kölcsönhatások közvetlen megfigyelését teszi lehetővé (Nagata H. és Handa H., 2000) (7.ábra).



**7.ábra. A kölcsönhatás folyamatának ábrázolása a szenzorgramon.**

Az analit kötődik a felületen immobilizált ligandhoz a minta injektálása során, jele növekedést eredményezve (Az injektálás kezdete=100 s a diagramon). Az injektálás végén a minta a folyamatosan áramló pufferre cserélődik és a jel csökkenése mutatja a kölcsönható partnerek disszociációját a felszínhez kötött komplexből. 1000 RU (rezonancia egység) válasz 1 ng/mm<sup>2</sup> felületi koncentrációban létrejövő változást jelent. (Sambrook és Russell, 2001)

A coch/vWFA2 domén, valamint a coch/LCCL domén és a humán I., II. és IV. típusú kollagének közötti kölcsönhatások vizsgálatát SPR analízissel végeztem Biacore X (GE Healthcare, Bécs, Ausztria) készülékkel.

A mérésekhez karboximetilezett dextrán felszínnel ellátott CM5 szenzorchipet használtam, amelyhez a ligand kovalensen kötődik aminos csoportjain keresztül. A chip felszínén lévő karboxil csoportok aktiválása N-hidroxisuccinimid (NHS) és N-etil-N'-(dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) keverék hozzáadásával történt, amely a ligand aminos csoportjaival spontán reagáló aktív észtereket képez. (Biacore X kézikönyv, 1997).

Immobilizáláshoz ligandként, az I., II. és IV. típusú humán kollagén (Chemicon International) feloldottam 50 mM Na-acétátban (pH 4.5); 30 µg/ml végkoncentrációban. A különböző kollagének oldataiból 5 µl/perc áramlási sebességgel injektáltam 10 percig, előzőleg NHS+EDC keverékével aktivált CM5 szenzorchip egyik áramlási cellájára. A ligand kapcsolódása után etanolamin injektálásával deaktiváltam a maradék aktív csoportokat. A

CM5 szenzorchipen található második áramlási cellát referenciának használtam, amelynél az immobilizálást a mérésekhez használt puffer injektálásával végeztem el. A referencia cella információt ad a nem-specifikus kölcsönhatásokról, illetve a pufferhatásból eredő törésmutató változásokról. A CM5 szenzorchippek és a kapcsoló reagensek a Biacore AB (Uppsala, Svédország) termékei voltak.

A kölcsönhatás mérésekhez analitként különböző koncentrációban injektáltam 80  $\mu$ l-t a coch/vWFA2 és coch/LCCL domének oldataiból 20  $\mu$ l/perc áramlási sebességgel. A ligand-kötési vizsgálathoz és a mosáshoz használt puffer összetétele: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,005% Tween 20, pH 7.5. Minden mérés után a chipet 5  $\mu$ l, 25 mM NaOH oldat 20  $\mu$ l/perc áramlási sebességgel történt injektálásával regeneráltam.

Minden injektálást legalább kétszer ismételtam. A referencia szenzorgramokat kivontam az immobilizált fehérjét tartalmazó első cellánál felvett szenzorgramokból. A különböző analit koncentrációk injektálása mellett analitot nem tartalmazó puffert is injektáltam. Az ebből kapott szenzorgramot kivontam az összes szenzorgramból, tehát az értékelésnél kettős kivonással kapott szenzorgramokkal dolgoztam.

Az adatok értékelését a BIAevaluation 4.0 szoftverrel végeztem. A kinetikai paraméterek meghatározásához a szenzorgramokat 1:1 Langmuir kötési modellel illesztettem. Az illesztések pontosságát a  $\chi^2$  értékkel jellemeztem: csak azt fogadtam el, amelynek  $\chi^2$  értéke nem haladta meg az  $R_{\max}$  érték 5%-át (Lin X és mtsai 2006). (Az  $R_{\max}$  érték az adott szenzorchip maximális analitkötő kapacitása.)

## **IV.6.2. Fémek hatásának vizsgálata a fehérjék kölcsönhatására**

A különböző kétértékű fémionok hatását a coch/vWFA2 domén és a kollagének kölcsönhatására SPR-rel vizsgáltam.

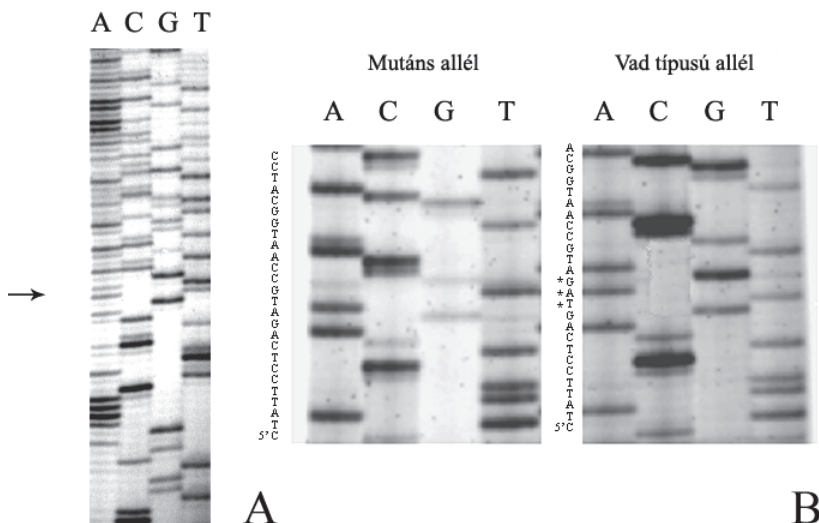
A coch/vWFA2 fehérjét 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , vagy 1mM  $\text{Mg}^{2+}$ , vagy 100  $\mu$ M  $\text{Zn}^{2+}$ -t tartalmazó Tris-HCl pufferben oldottam fel és 80  $\mu$ l-t injektáltam különböző koncentrációkból a kollagén chip felszínére. A puffer pontos összetétele ezekenél a méréseknél 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7.5 kiegészítve a megfelelő kationnal. A mérések a fent leírtak szerint történtek.

## V. Eredmények és megvitatásuk

### V.1. A V104del mutáció azonosítása

A Semmelweis Orvostudományi Egyetem Fül-Orr-Gégészeti, Fej-és Nyaksebészeti Klinikájával együttműködésben cochleáris implantátummal rendelkező, a DFNA9 típusú sükettség diagnosztikus kritériumai szerint szelektált betegeknél szekvencia elemzést végeztem a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában. Összesen 29 teljes hallásvesztéssel érintett személy DNS mintáját vizsgáltam meg, 26 családból. A dideoxi szekvenálást követő autoradiográfiás értékeléssel 1 beteg személynél mutattam ki heterozigóta formában megjelenő ismeretlen típusú mutációt az LCCL domén 5. exonjában (8.ábra, **A**).

A mutáció pontos helyének és típusának meghatározásához az érintett DNS szakaszt M13mp19 vektorba klónoztam, így szeparáltam a vad típusú és a mutáns alléleket. A fág DNS szekvenálása megerősítette, hogy az egyik allél vad típusú, míg a mutáns allélnél az 5. exonban három nukleotid (TAG) deletálódik (8.ábra, **B**).



8. ábra. A TAG nukleotidok deléciójának kimutatása a *COCH* gén LCCL domént kódoló 5. exonjában dideoxi-szekvenálással.

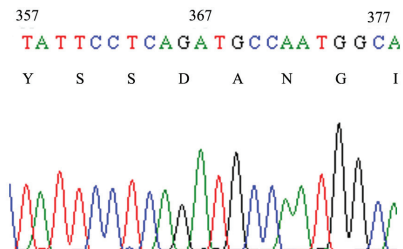
A mintákat LKB Macrophor elektroforézis készülékkel, denaturáló poliakrilamid gélen futtattam meg és autoradiográfiával értékeltem ki. (A) A mutációt hordozó személy genomális DNS-ének dideoxi szekvenálása. Heterozigóta formában megjelenő mutációra utal az eltolódott szekvencia. A nyíl jelzi a szekvencia eltolódását a deléció helyétől. (B) A mutációval érintett DNS szakasz M13mp19 vektorba klónozása után meghatároztam a vad típusú és a mutáns allél szekvenciáját. A vad típusnál csillaggal jelölt nukleotidok deletálódnak a mutáns allél szekvenciájából.

A vad típusú és mutáns fág klónokból dupla szálú DNS létrehozása után az automata szekvenátorral végzett szekvenálás is megerősítette a *COCH* gén 5. exonjában a 367-369. pozícióban található TAG nukleotidok delécióját (9. ábra). A három nukleotidot érintő deléció a 104. valin delécióját eredményezte az aminosav szekvenciában, amely nem okozott eltolódást a leolvasási keretben.

### Vad típusú allél



### Mutáns allél



**9. ábra.** A TAG nukleotidok deléciójának azonosítása az érintett személy *COCH* génjének 5. exonjában automata szekvenátorral (ABI PRISM 3100 ) végzett dideoxi szekvenálással.

A deléció a 367-369. nukleotidokat érinti. A szekvenciában az LCCL doménnek megfelelő aminosavakat egybetűs kód jelzi; a pirossal jelölt valin deletálódik a mutáns szekvenciában, a leolvasási keret eltolódása nélkül.

A többi vizsgált betegnél, és az 50 egészséges kontroll személynél nem találtam mutációt a *COCH* gén LCCL domént kódoló 4. és 5. exonjában.



## V.2. A mutáció eredetére vonatkozó esetismertetés

A mutációt hordozó beteg személynél először 32 éves korában észleltek halláskárosodást, súlyos szédüléssel, émelygéses tünetekkel. Először a bal, majd néhány év múlva a jobb fülben is súlyos halláskárosodást figyeltek meg. A beteg 50 éves korára minden frekvenciára kiterjedő teljes hallásvesztés alakult ki.

A beteg cochleáris implantátumot kapott, amely nem javította a hallását. A legújabb vizsgálatok teljes cochleovesztibuláris areflexiát mutattak mindkét fülnél, valamint szédüléssel, tünetekkel. A családi előfordulás tisztázása nem lehetséges a családtagok korai halála miatt. A betegnek nincs testvére, édesanyja egészséges, az édesapja fiatalon elhunyt. A beteg siketségben nem szenvedő gyermekének DNS vizsgálata nem mutatott ki mutációt a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában. Mindezek alapján, bár a beteg édesapjánál nem lehet kizárni a mutáció meglétét, a *de novo* mutációs eredet is lehetséges.

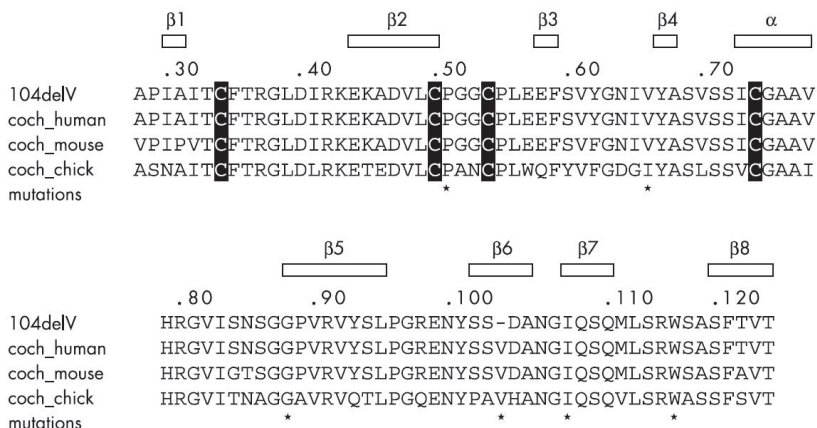
## V.3. A V104del és az I109N mutációk hatásának vizsgálata a humán cochlin LCCL doménjének szerkezetére

### V.3.1. A V104del mutációval érintett LCCL domén expressziója

Az általam azonosított V104del mutációnak az LCCL domén szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálatához, a korábbi mutáns konstrukcióknál is alkalmazott pMed23 bakteriális expressziós rendszerben előállítottam a mutáns fehérjét. Az expressziós konstrukció elkészítéséhez templátként a beteg személy DNS mintáját használtam (Az LCCL domént kódoló 4. exon amplifikálásához a beteg személy genomális DNS-ét használtam templátként, míg az 5. exon amplifikálásához a mutáns allélt tartalmazó M13mp19 klónt).

Az expressziót követően, a vad típusú és az eddig vizsgált mutáns LCCL doméneknel alkalmazott refoldálási körülmények között a V104del mutáns fehérje teljes mennyiségben kicsapódott, oldhatatlan aggregátumot képezve.

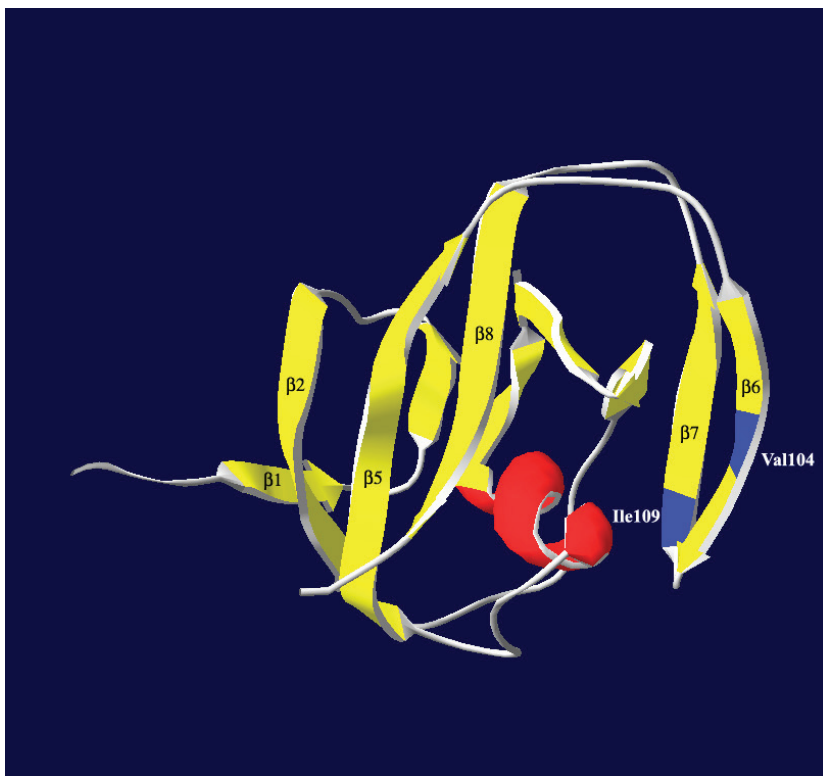
Ha megnézzük a mutációk helyét a szekvenciában, látható, hogy a mutációk többsége, beleértve a V104del mutációt is, a másodlagos szerkezeti elemeket kialakító konzervatív aminosavakat érintve nagymértékben befolyásolhatja a szerkezet kialakulását és stabilitását. (10. ábra)



**10. ábra.** Különböző fajokból származó cochlin fehérjék LCCL doménjeinek összehasonlító-szekvencia elemzése. (Nagy és mtsai, 2004)

A humán (coch\_human, 28-124. aminosav), egér (coch\_mouse, 30-126. aminosav), és csirke (coch\_chicken, 24-120. aminosav) cochlin fehérjék LCCL doménjeinek konzervált ciszteinei fekete színnel jelöltek. A felső szekvencia az általam azonosított V104del mutáns LCCL domén szekvenciája. A munkacsoportunkban vizsgált, DFNA9 betegséget okozó mutációk helyét csillag jelöli. A szekvenciák fölött a másodlagos szerkezeti elemek pozíciója látható.

A V104del mutáns LCCL domén esetében, az eddigi mutáns fehérjék többségével megegyezően, nem alakult ki a natív fehérjeszerkezet. A 6. β-szalag szerkezetében lévő 104. valin konzervált aminosav a különböző fajokban megtalálható cochlin fehérjék LCCL doménjében (10.ábra), tehát a mutáció káros hatása ez esetben is a domén szerkezetének kialakításában esszenciális β-struktúra destabilizálásában nyilvánul meg (Nagy és mtsai, 2004) (11.ábra).



**11.ábra.** A vizsgált DFNA9 típusú hallásvesztést okozó *COCH* gén mutációk által érintett aminosavak lokalizációja az LCCL domén szerkezetében.

Az LCCL domén koordinátái (1JBI) a PDB (Protein Data Bank) adatbázisból származnak. Az adott ábrázolás mellett jól látható, sárga színnel jelölt  $\beta$ -szalagok számozása a 10.ábrán megadott sorrendet követi. Az  $\alpha$ -hélix piros színnel jelölt. Kék színnel jelöltem a vizsgált, mutációval érintett 104. valin, valamint a 109. izoleucin aminosavak pozícióját.

### **V.3.2. Az I109N mutációval érintett LCCL domén expressziója *Pichia pastoris*-ban és bakteriális expressziós rendszerben**

Az I109N aminosavcserével az LCCL domén szekvenciája úgy módosul, hogy kialakul egy NXS motívum(.....GNQSQ.....), amely új N-glikozilációs helyet eredményez (a humán cochlin fehérje vad típusú LCCL doménje már tartalmaz egy N-glikozilációs helyet).

A bakteriális expressziós rendszer nem alkalmas a fehérjék glikozilációjának vizsgálatára, ezért eukarióta expressziós rendszert (*Pichia pastoris*) alkalmazva előállítottam mind a vad típusú, mind az I109N mutáns LCCL domént, annak vizsgálatára, hogy az I109N mutáns szekretálódik-e *Pichia* expressziós rendszerben glikozilált fehérjeként.

A pPICZ $\alpha$ A/LCCL\_I109N konstrukciónál, bár az expressziós plazmid integrálódott az élesztő kromoszómába, egyik *Pichia* klónból történő indukciónál sem tudtam kimutatni rekombináns I109N mutáns LCCL domént.

A pPICZ $\alpha$ A/LCCL (vad típusú) expressziós plazmiddal transzformált *Pichia* törzs klónjainak felnevesztése és indukciója után a felülszóból detektáltam egy kb. 18 kDa méretű fehérjét. A szekretált fehérjének meghatároztuk az N-terminális aminosav szekvenciáját: **EAELTAPIAIT**, amelyből a vastag betűvel jelzett aminosavak az LCCL doménnek felelnek meg, a többi a vektorból származó aminosav. A rekombináns coch/LCCL számított molekulatömege 12052 Da, a fehérje megfigyelt molekulatömege nagyobb, jelezve a glikozilációt.

Eredményeim azt mutatják, hogy az I109N mutáció az LCCL domén szerkezetének kialakulását befolyásolhatja, mivel a *Pichia pastorisban* történő expresszió nem eredményezett fehérje terméket.

Az I109N mutáció LCCL domén szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálatához, az eddigi mutánsokkal megegyezően pMed23 bakteriális expressziós rendszerben is előállítottam a mutáns fehérjét. A fehérje expresszióját követően a refoldálás során a fehérje teljes mennyisége kicsapódott, oldhatatlan aggregátumot képezve, tehát nem alakult ki a fehérje natív szerkezete. Az I109N konzervált aminosavat érint a különböző fajokból származó cochlin fehérjék LCCL doménjében (3.ábra). A 109. izoleucin aminosav oldallánca teljesen eltemetett pozícióban található (oldószernek való kitettség alacsony) (Liepinsh és mtsai, 2001), a 6. és 7.  $\beta$ -redők közötti hajtókanyar végének közelében (11.ábra), ezért az I109N mutáció destabilizálja az antiparallel  $\beta$ -struktúrákat, valamint a központi elhelyezkedésű  $\alpha$ -hélixhez való asszociációt.

## V.4. Következtetések a DFNA9 patomechanizmusára

Táblázatba foglalva összehasonlítottam az eddigi vizsgált betegséget okozó mutációkat és az LCCL domén szerkezetére gyakorolt hatásait.

Mutáció	Genotípus	A betegség kezdete	Az LCCL domén szerkezetének kialakulása
V104del*	heterozigóta	40 éves korban	hibás
I109N	heterozigóta	20-30 éves korban	hibás
V66G	heterozigóta	20-30 éves korban	hibás
G88E	heterozigóta	50 éves korban	hibás
W117R	heterozigóta	50 éves korban	normális
P51S	heterozigóta	40 éves korban	hibás

3 .táblázat. A DFNA9 betegséget okozó LCCL domént érintő mutációk összehasonlítása

\*Nagy és mtsai 2004

(piros színnel jelöltem az általam vizsgált mutánsokat, a többi mutáns konstrukció korábban készült munkacsoportunkban)

A vizsgált mutációk mind heterozigóta formában jelentek meg, ami a betegség domináns kifejeződésére utal. A tünetek megjelenése minden esetben felnőtt korra tehető, a mutációk többsége az LCCL domén szerkezetének kialakulását és stabilitását befolyásolja. A domináns fenotípust megerősíti, hogy a mutációk funkcionyeréses mechanizmus által hatnak, a hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérje jelenléte okozza a betegséget.

A domináns negatív hatás a W117R mutáns esetében is kifejeződik: a mutáns fehérje kompetitív inhibitora lehet a vad típusú fehérjének, gátolva annak partneréhez való kötődését és ezáltal az extracelluláris mátrixba való integrálódását.

Eredményeink igazolják a betegség patomechanizmusára vonatkozó feltevéseket. A DFNA9 típusú sükettségben szenvedő betegek belső fülében megtalálható, jellegzetes nem sejtjes eredetű lerakódás az aberráns, hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérjék aggregátuma lehet. Robertson és munkatársai (2003) kimutatták, hogy az általuk vizsgált DFNA9-et okozó mutációk nincsenek hatással az emlős sejtek által termelt cochlin fehérjék szekréciójára és poszttranszlációs módosítására, valamint ezzel párhuzamosan

Grabski és munkatársai (2003) leírták, hogy a cochlin mutánsok nem megfelelően integrálódtak a cochlea extracelluláris mátrixába.

Valószínűleg *in vivo* a mutáns cochlin fehérjék évek alatti lassú felhalmozódása a belső fül szövetében, a neuronok progresszív degenerációjához és a sükettség kialakulásához vezethet. Erre utal a betegség kései megjelenése és progresszív jellege is (Nagy és mtsai, 2004).

A *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában azóta még három missense pontmutációt azonosítottak: G87W (Collin és mtsai, 2006), I109T (Pauw és mtsai, 2007) és A119T (Usami és mtsai, 2003), amelyek tovább bizonyítják a mutációval érintett LCCL domén fontos szerepét a DFNA9 típusú hallásvesztés kialakulásában.

## V.5. Fehérje kölcsönhatások vizsgálata

Street és mtsai 2005-ben, valamint Yuan és mtsai 2008-ban azonosítottak három új mutációt a *COCH* génben, amelyek a cochlin C-terminális von Willebrand faktor (vWFA2) doménjét érintik. A C542F és C542Y mutáció miatt nem alakul ki az intramolekuláris C362-C542 diszulfid-kötés, ami destabilizálhatja a vWFA2 domént és párosítatlan ciszteint eredményez a 362. pozícióban. Mindezek intermolekuláris diszulfid-kötések kialakulásához vezethetnek a cochlin fehérjék között, vagy a cochlin és egyéb extracelluláris mátrix fehérjék között. A harmadik, M512T mutáció, amely a W117R LCCL domént érintő mutációhoz hasonlóan nem erősen konzervált a különböző vWFA doménekben, nem feltétlenül eredményez hibás szerkezetű fehérjét.

A mutáns cochlin fehérjék domináns negatív hatásának egyik magyarázata, hogy a mutánsok nem megfelelően integrálódnak a belső fül extracelluláris mátrixába, ha a mutáció valamely mátrix komponenshez való kötődést gátol. A strukturális változások súlyos károsító hatással lehetnek az érzékelő funkciókra.

A cochlin fehérjével kölcsönható ECM komponensek nem ismertek, bár vannak feltételezett kötőpartnerek. Például szövettani vizsgálatok kimutatták, hogy a DFNA9 által érintett betegeknél hiányoznak a rendezett struktúrájú II. típusú kollagén kötegek, amelyek az egészséges személyeknél megtalálhatók (Khetarpal és mtsai 2000). Újabban patkány félkörös ívjáratának immuno-elektronmikroszkópos analízisével a cochlint és a II. kollagént

ugyanabban a fibrilláris anyagban mutatták ki a szubepitéliális régióban (Mizuta és mtsai 2008).

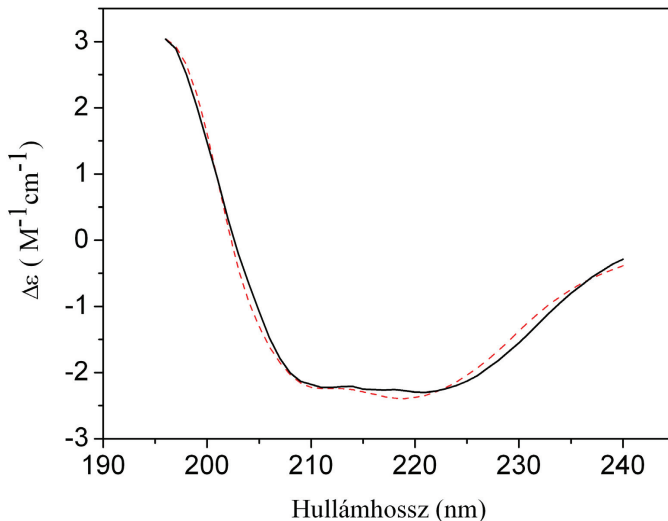
Ezen eredmények alapján célul tűztem ki különböző kollagének és a cochlin fehérje doménjei (LCCL, vWFA1 és vWFA2) közötti kölcsönhatások vizsgálatát.

### **V.5.1. A cochlin A típusú von Willebrand faktor doménjeinek expressziója és szerkezeti jellemzése**

A pPICZ $\alpha$ A/vWFA1 konstrukciónál, bár az expressziós plazmid integrálódott az élesztő kromoszómába, egyik *Pichia* klónból történő indukciónál sem tudtam kimutatni rekombináns coch/vWFA1 fehérjét.

A pPICZ $\alpha$ A/vWFA2 expressziós plazmiddal transzformált *Pichia* törzs klónjainak felnövészése és indukciója után a felülírási módszerrel detektáltam egy kb. 22 kDa méretű fehérjét. A szekretált fehérjének meghatároztuk az N-terminális aminosav szekvenciáját: **EAEAEFSKTCYNS**, amelyből a vastag betűvel jelzett aminosavak a vWFA2 doménnek felelnek meg, a többi a vektorból származó aminosav. A rekombináns coch/vWFA2 számított molekulatömege 22.762 Da, amely megegyezik a jóslott és megfigyelt molekulatömeggel, jelezve, hogy a fehérje nem glikozilált.

A vWFA2 domén szerkezeti integritását CD spektroszkópiával jellemeztem. A coch/vWFA2 CD spektruma nagyon hasonlít a vWFA domén-család többi tagjának spektrumára (Fairbanks és mtsai, 1995; Hinshelwood, 2000): 210 nm-től 225 nm-ig egy nagy negatív szélsőértékkel, valamint e két hullámhossz között egy kis átmenettel jellemezhető (12.ábra).

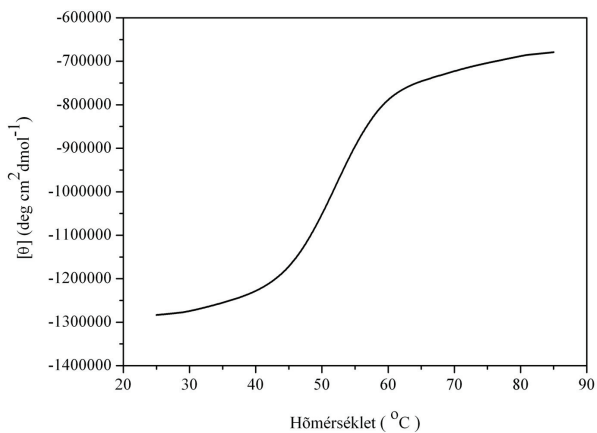
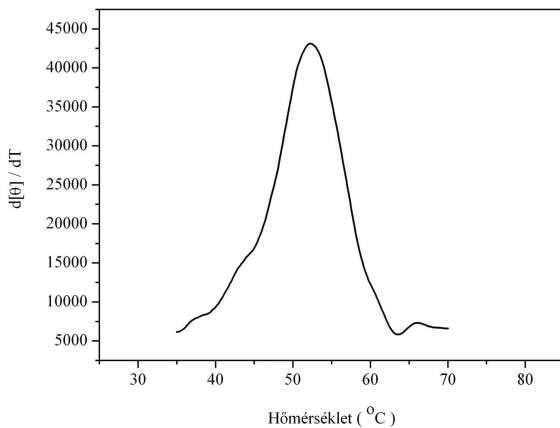


**12. ábra. A rekombináns humán cochlin vWFA2 doménjének távoli UV cirkuláris dikroizmus spektruma (Nagy és mtsai, 2008)**

A folytonos vonal a rekombináns fehérje spektrumát, a szaggatott vonal pedig a fehérje CDPro programmal jósolt spektruma, amely 16,5 % szabályos  $\beta$ -redőből, 9,2 % torzult  $\beta$ -redőből, 12,5 % szabályos  $\alpha$ -hélixből, 11,4 % torzult  $\alpha$ -hélixből, 21,2 % kanyarból és 29,2 % rendezetlen szerkezetből áll. A spektrumokat 25 mM Tris-HCl pH 8.0 oldatban vettem fel, 0,2 mg/ml fehérjét tartalmazó oldatban, 25 °C-on.

A spektrumok CDPro szoftverrel történt elemzése 16,5 % szabályos  $\beta$ -redőt, 9,2 % torzult  $\beta$ -redőt, 12,5 % szabályos  $\alpha$ -hélixet, 11,4 % torzult  $\alpha$ -hélixet, 21,2 % kanyart és 29,2 % rendezetlen szerkezetet jósolt. A von Willebrand faktor fehérje A1 és A3 doménjének kristályszerkezeti elemzése szerint a vWFA domének egy  $\alpha$ -hélixek által körülzárt  $\beta$ -lemezből állnak (Rossmann típusú szerkezet) (Huizinga és mtsai, 1997; Emsley és mtsai, 1998). Ezt valószínűsíti a CD spektrumok elemzése a coch/vWFA2 domén esetében is, de csak további szerkezet vizsgálatokkal bizonyítható, hogy valóban Rossmann típusú a szerkezet.



**A****B**

**13. ábra. A rekombináns humán cochlin/vWFA2 domén CD spektrumának hőmérsékletfüggése (Nagy és mtsai, 2008)**

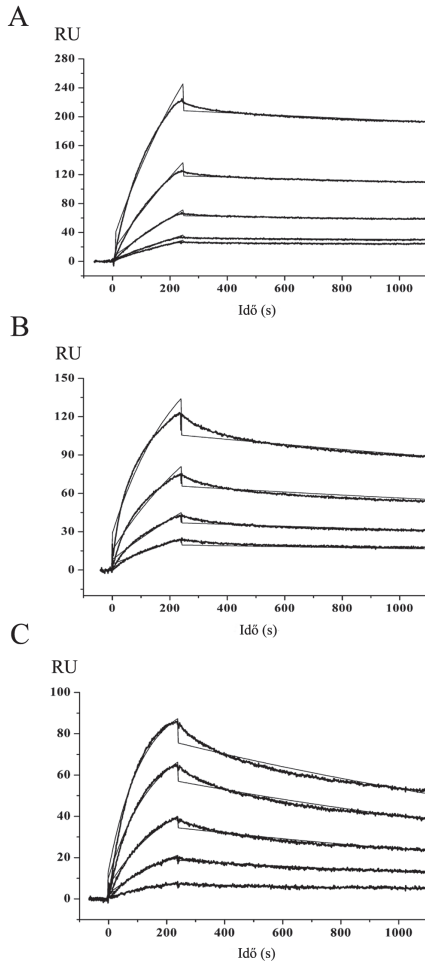
(A) CD spektrum változásait 222 nm-en, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 pufferben követtem 25  $^{\circ}\text{C}$ -85  $^{\circ}\text{C}$ -ig, 50  $^{\circ}\text{C}/\text{óra}$  felfűtési sebességgel. (B) A rekombináns fehérje olvadási hőmérsékletét a CD változás deriválásával határoztam meg a J-700 Spectra Analysis Program for Windows 95/NT version 1.53.04. felhasználásával.

A rekombináns coch/vWFA2 fehérje hődenaturációjának vizsgálatánál alkalmazott hullámhossz kiválasztásához a különböző hőmérsékleteken felvett CD spektrumok változását követtem. A CD jel változása 222 nm-en a legnagyobb, ezt a hullámhosszt alkalmazva a hődenaturáció egy éles átmenet mutatott 52 °C-os olvadásponttal ( $T_m$ ), jelezve a fehérje natív szerkezetét, amely kooperatív módon omlik össze (13. ábra).

#### **V.5.2. A coch/vWFA2 domén, a coch/LCCL domén és a humán I., II. és IV. típusú kollagének kölcsönhatásának vizsgálata**

A rekombináns coch/vWFA2 domén, valamint a rekombináns coch/LCCL domén kölcsönhatását a szenzor chipек felületén immobilizált humán I., II. és IV. típusú kollagénekkel felületi plazmon rezonancia (a továbbiakban SPR) mérésekkel vizsgáltam.

A coch/vWFA2 domén különböző koncentrációjú oldatainak injektálása után felvett szenzogramok alapján a vWFA2 domén kötődött az I, II. és IV. típusú kollagénekhez (14. ábra).



**14. ábra. A humán cochlin vWFA2 doménje és a humán I., II., és IV típusú kollagének közötti kölcsönhatás jellemzése felületi plazmon rezonancia mérésekkel (Nagy és mtsai, 2008).**

A kölcsönhatások szenzorgramjai: (A) vWFA2 domén (0.2, 0.25, 0.5, 1 és 2  $\mu$ M) az I. típusú kollagénnel; (B) vWFA2 domén (0.25, 0.5, 1 és 2  $\mu$ M) a II. típusú kollagénnel; (C) vWFA2 domén (0.3, 0.5, 1, 1.5 és 2  $\mu$ M) a IV. típusú kollagénnel.

Az SPR mérésekből meghatároztam a kölcsönhatások kinetikai paramétereit 1:1 arányú ligand-analit kötést feltételezve. A kölcsönhatások számított egyensúlyi disszociációs állandói a következők: vWFA2-I. kollagén:  $7,97 \times 10^{-8}$  M, vWFA2-II. kollagén:  $9,45 \times 10^{-8}$  M, vWFA2-IV. kollagén:  $1,10 \times 10^{-7}$  M. Az asszociációs és disszociációs reakciók sebességi állandóit a 4. táblázat tartalmazza.

Kölcsönható fehérjék	$K_d$ érték	$k_a$	$k_d$
I. típusú kollagén* — vWFA2	$7,97 \times 10^{-8}$	$1,14 \times 10^3$	$9,07 \times 10^{-5}$
II. típusú kollagén* — vWFA2	$9,45 \times 10^{-8}$	$2,10 \times 10^3$	$1,98 \times 10^{-4}$
IV. típusú kollagén* — vWFA2	$1,10 \times 10^{-7}$	$4,14 \times 10^3$	$4,57 \times 10^{-4}$

\*szenzorchipen immobilizált fehérje

**4. táblázat. A humán cochlin vWFA2 doménje és a humán I., II., és IV. kollagének közötti kölcsönhatás kinetikai paramétere (Nagy és mtsai, 2008).**

Az asszociációs ( $k_a$ ) és disszociációs ( $k_d$ ) reakciók sebességi állandóit, valamint az egyensúlyi disszociációs állandók értékeit ( $K_d$ ) a felületi plazmon rezonancia mérésekből határoztam meg a Biaevaluation 4.0 szoftver használatával.

További SPR méréseket végeztem a vWFA2 domén különböző fémeket tartalmazó oldataival: 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  vagy 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  jelenlétében a vWFA2 domén nem mutatott nagyobb affinitást a különböző kollagénekhez.

A pMed23 bakteriális expressziós rendszerben korábban előállított és jellemzett (Trexler és mtsai, 2000) LCCL domén különböző koncentrációjú oldatait használtam az SPR mérésekhez. Az LCCL domén oldatának injektálása után felvett szenzorgramok alapján az LCCL domén egyik kollagénhez sem kötődött, még a legnagyobb alkalmazott ( $5\mu\text{M}$ ) koncentrációban sem.

Az A típusú von Willebrand faktor doméneket tartalmazó fehérjék közül számos extracelluláris mátrix összetevő, vagy sejtfelszíni receptor vWFA doménje részt vesz kollagénnel való kölcsönhatás kialakításában. (Tuckwell és mtsai, 1996; Hoylaerts és mtsai, 1997).

Az általam vizsgált kollagének közül a II. típusú különösen fontos, mert ilyen típusú kollagén rostok degradációja a DFNA9 hallásvesztés hisztopatológiai markere, valamint ismert a cochlinnal való együttes előfordulása. Kimutattam, hogy a cochlin C-terminális vWFA doménje és a II. típusú kollagén között kölcsönhatás alakul ki, amely valószínűleg fontos szerepet játszik a belső fül szerkezeti homeosztázisának fenntartásában.

Annak eldöntésére, hogy a cochlin II. típusú kollagénnel kialakított kölcsönhatása mennyire specifikus, egy fibrilláris (I. kollagén) és egy hálózati struktúrákat alkotó (IV. típusú) kollagénnel is elvégeztem a kölcsönhatás vizsgálatokat.

Kimutattam, hogy a cochlin az I. és IV. típusú kollagénhez is kötődik, de nem tudjuk, hogy e kölcsönhatásoknak van-e fiziológiai jelentősége.

A IV. típusú kollagénről ismert, hogy a sejteket és kötőszöveti struktúrákat elválasztó bazális membránok egyik fő alkotóeleme. IV. típusú kollagént tartalmazó bazális membrán köti össze az epiteliális sejteket a kötőszövettel a cochlea különböző részeiben: a spirális limbusban, a baziláris membránban és a spirális szalagban (Kalluri és mtsai, 1998; Satoh és mtsai, 1998; Tsuprun és mtsai, 2001). A cochlin fehérje ezekben a struktúrákban expresszálódik, ezért lehetséges, hogy a IV. típusú kollagénnel való kölcsönhatás kimutatásának van fiziológiai jelentősége.

Nem ismert az I. kollagén expressziós mintázata a belső fül cochlint is expresszáló struktúráiban. A cochlin és az I. kollagén kölcsönhatása a cochlint expresszáló egyéb szövetekben lehetséges.

Sok vWFA domén köt kétértékű fémionokat egy nem-folyamatos szekvencia motívumon keresztül, amelyet MIDAS-nak (Metal Ion Dependent Adhesion Site) neveznek. A MIDAS-motívum 5 konzervált fémion-koordináló aminosavból épül fel: ebből három alkotja a lineáris motívumot: Asp-X-Ser-X-Ser; a maradék két aminosav (Thr és Asp) távolabb helyezkedik el a különböző vWFA domének szekvenciájában. Az integrinek esetében a vWFA domén MIDAS-motívuma által kötött kation részt vesz a ligand kötésében (Xiong és mtsai, 2002). Ezzel ellentétben a von Willebrand faktor A3 doménje, amely az elsődleges kötőhelye az I. és III. kollagének, nem tartalmaz MIDAS-motívumot és a vWFA

domén általi kollagén felismerési mechanizmusa eltérő az integrinekétől (Bienkowska és mtsai, 1997). A von Willebrand faktor fehérje A3 doménjének szerkezeti vizsgálatából valóban kiderült, hogy a kollagénkötő hely távol esik az integrinek homológ vWFA doménjeiben található kollagénkötő felszínektől (Romijn és mtsai, 2001, 2003).

A cochlin fehérje vWFA2 doménjében is konzervált MIDAS motívum található: Asp-373, Ser-375, Ser-377, Thr-446 és Asp-475 aminosavak alkotják a kétértékű kation kötőhelyet. Nem bizonyítottam, hogy a cochlin vWFA2 doménje valóban köt fémeket, de SPR méréseim eredményei szerint a kétértékű kationok jelenléte nem befolyásolja a coch/vWFA2 domén és a humán I., II. és IV. típusú kollagének közötti kölcsönhatást, ezért a coch/vWFA2 domén kollagén felismerési mechanizmusa az integrinekétől eltérő lehet.

Mivel még nem ismerjük a cochlin vWFA2 doménjének három-dimenziós szerkezetét, valamint a kollagénkötő hely lokalizációját, nem tudjuk, hogy a nemrég azonosított vWFA2 domént érintő M512T mutáció a domén szerkezetének kialakulását, vagy a kollagénekhez való kötést befolyásolja.

Vizsgálataim alapján, azok a mutációk, amelyek a cochlin extracelluláris mátrix komponensekhez való kötődését gátolják, megakadályozhatják a cochlin normális funkciójának betöltését a belső fülben. Munkámban kísérletesen bizonyítottam, hogy a cochlin vWFA2 doménje kölcsönhatást alakít ki az I., II. és IV. típusú kollagénekkel, de a cochlin LCCL doménjével kölcsönható extracelluláris mátrix komponens még ismeretlen.

## VI.Összefoglalás

A doktori munkám főbb eredményei az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Magyar populációból, a DFNA9 diagnosztikai kritériumai alapján kiválasztott süket betegek genomiális DNS-ének szekvencia elemzése során, egy beteg személynél azonosítottam a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában egy új típusú, heterozigóta formában megjelenő mutációt, amely DFNA9 típusú hallásvesztést eredményez. Ez a magyar populációban azonosított első, a világon a hetedik azonosított *COCH* gént érintő mutáció típus, amely a DFNA9 hallásvesztéshez köthető.
2. A mutációval érintett DNS szakasz klónozásával meghatároztam a mutáció pontos helyét és típusát: egy, az 5.exonban, a 367-369. nukleotidokat érintő deléció, amely a cochlin fehérje LCCL doménjében a 104. pozícióban lévő valin delécióját eredményezte, a leolvasási keret eltolódása nélkül. A vizsgált egészséges kontroll személyeknél nem volt mutáció az LCCL domén szekvenciájában.
3. Rekombináns úton, bakteriális expressziós rendszerben előállítottam az általam azonosított V104del mutáns LCCL domént, valamint a korábban azonosított, még nem vizsgált I109N mutációt tartalmazó LCCL domént.
4. A munkacsoportunk által korábban expresszált mutánsok többségével egyezően, az általam expresszált Val104del és I109N mutáns LCCL domén esetében sem alakult ki a fehérje natív szerkezete, hanem oldhatatlan aggregátum formájában kicsapódott.
5. Az LCCL domén meglévő szerkezeti információinak alapján e két mutáns fehérje esetében megállapítottam, hogy a mutációk konzervált aminosavakat érintenek és káros hatásuk az LCCL domén szerkezetének kialakításában esszenciális  $\beta$ -struktúrák destabilizálásában nyilvánul meg.
6. A mutációk hatásának vizsgálatai megerősítették a DFNA9 patomechanizmusára vonatkozó korábbi feltevéseket, amely szerint a betegek belső fülében megtalálható nem sejtes eredetű lerakódás, a hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérjék aggregátuma, amely évek alatt, lassan felhalmozódva a belső fül szöveteiben, a neuronok progresszív degenerációját okozza.
7. Vizsgálataim megerősítették, hogy a mutációk funkcionyeréses mechanizmus által hatnak: a mutáns fehérje jelenléte és nem elégtelen működése okozza a betegséget.

8. A munkám második részében rekombináns úton előállítottam a humán cochlin fehérje C-terminális A típusú von Willebrand faktor doménjét (vWFA2).
9. A coch/vWFA2 domén CD-spektuma alapján megállapítottam, hogy a domén a vWFA-domén család többi tagjához hasonló szerkezettel rendelkezik. A rekombináns domén olvadáspontja 52 °C.
10. Felszíni plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel megállapítottam, hogy a rekombináns humán coch/vWFA2 domén kötődik a humán I., II., és IV. típusú kollagénekhez, míg a rekombináns humán coch/LCCL domén nem mutat affinitást egyik kollagén típushoz sem. A szenzorgramok elemzéséből meghatároztam, hogy a coch/vWFA2 domén I., II., és IV. típusú kollagénekkel való kölcsönhatásának egyensúlyi disszociációs állandói:  $7.97 \times 10^{-8}$  M,  $9.45 \times 10^{-8}$  M, és  $1.1 \times 10^{-7}$  M.
11. Felszíni plazmon rezonancia mérésekkel megállapítottam, hogy a különböző kétértékű fémionok nincsenek hatással a humán coch/vWFA2 különböző típusú kollagénekkel kialakított kölcsönhatására. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a cochlin vWFA2 doménje általi kollagén felismerési mechanizmus különbözik a fémkötő motívummal (MIDAS) rendelkező vWFA domént tartalmazó fehérjékétől, például az integrinekétől.
12. Vizsgálataim megerősítik azt a korábbi feltevést, amely szerint a cochlin és a II. kollagén kölcsönhatása fontos szerepet játszik a cochlea és vestibulum szerkezeti homeosztázisában. A kölcsönhatás vizsgálatok alapján lehetséges továbbá, hogy a cochlin extracelluláris mátrix komponensekkel kialakítandó kölcsönhatását gátló mutációk akadályozzák a normális cochlin fehérje működését a belső fülben.



## VII. Hivatkozások

- Baek,M.J., Park,H.M., Johnson, J.M., Altuntas, C.Z., Jane-Wit,D., Jaini, R., Solares, C.A., Thomas, D.M., Ball, E.J., Robertson, N.G. et al. (2006) Increased frequencies of cochlin-specific T cells in patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J. Immunol.*, 177, 4203–4210.
- Bhattacharya, A.A., Lupher, M.L., Staunton, D.E.Jr., and Liddington, R.C. (2004) Crystal structure of the A domain from complement factor B reveals an integrin-like open conformation. *Structure*. 12, 371-378.
- Bienkowska, J., Cruz, M., Atiemo, A., Handin, R. and Liddington, R. (1997) The von willebrand factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J. Biol. Chem.* 272, 25162–25167.
- Bischoff, A.M., Huygen, P.L., Kemperman, M.H., Pennings, R.J., Bom, S.J.,Verhagen,W.I., Admiraal, R.J., Kremer, H. and Cremers, C.W. (2005) Vestibular deterioration precedes hearing deterioration in the P51S COCH mutation (DFNA9): an analysis in 74 mutation carriers. *Otol. Neurotol.*, 26, 918–925.
- Boulassel, M.R., Tomasi, J.P., Deggouj, N. and Gersdorff, M. (2001) COCH5B2 is a target antigen of anti-inner ear antibodies in autoimmune inner ear diseases. *Otol. Neurotol.*, 22, 614–618.
- Claudianos, C., Dessens, J.T., Trueman, H.E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G.A., Crompton, T., and Sinden, R.E. (2002) A malaria scavenger receptor-loke protein essential for parasite development. *Mol. Microbiol.* 45, 1473-1484.
- Collin, R.W., Pauw, R.J., Schoots, J., Huygen, P.L., Hoefsloot, L.H., Cremers, C.W. and Kremer, H. (2006) Identification of a novel COCH mutation, G87W, causing autosomal dominant hearing impairment (DFNA9). *Am J Med Genet A*, 140, 1791–1794.

- Colombatti, A. and Bonaldo, P. (1991) The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*, 77, 2305–2315
- Colombatti, A., Bonaldo, P. and Doliana, R. (1993) Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix*, 13, 297–306
- Cryns, K., and Van Camp, G. (2004) Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol. Neurotol.* 9, 2-22.
- de Kok, Y.J.M., Bom, S.J.H., Brunt, T.M., Kemperman, M.H., van Beusekom, E., van der Velde-Visser, S.D., Robertson, N.G., Morton, C.C., Huygen, P.L.M., Verhagen, W.I.M. et al. (1999) A Pro51Ser mutation in the COCH gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss with vestibular defects. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 361–366.
- Delrieu, I., Waller, C.C., Mota, M.M., Grainger, M., Langhorne, J., and Holder, A.A. (2002) PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in Plasmodium falciparum gametocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121. 11-20.
- Dessens, J.T., Sinden, R.E., and Claudianos, C. (2004) LCCL proteins of apicomplexan parasites. *TRENDS in Parasitology*, 20, 102-108.
- Emsley, J., Cruz, M., Handin, R. and Liddington, R. (1998) Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 273, 10396–10401.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. and Liddington, R.C. (2000) Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *Cell*. 101, 47–56.
- Fairbanks, M.B., Pollock, J.R., Prairie, M.D., Scahill, T.A., Baczynskyj, L., Heinrikson, R.L., et al. (1995) Purification and structural characterization of the CD11b/CD18 integrin alpha subunit I domain reveals a folded conformation in solution. *FEBS Lett.* 369, 197–201.

- Fransen, E., Verstrecken, M., Verhagen, W.I.M., Wuyts, F.L., Huygen, P.L.M., D0Haese, P., Robertson, N.G., Morton, C.C., McGuirt, W.T., Smith, R.J.H. et al. (1999) High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with amutation in the COCH gene. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1425–1429.
- Grabski, R., Szul, T., Sasaki, T., Timpl, R., Mayne, R., Hicks, B., et al. (2003) Mutations in COCH that result in non-syndromic autosomal dominant deafness (DFNA9) affect matrix deposition of cochlin. *Hum. Genet.* 113, 406–416.
- Hilgert, N., Smith, J. H. R. and Van Camp, G. (2008) Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat. Res.* (in press)
- Hinshelwood, J. and Perkins, S.J. (2000) Metal-dependent conformational changes in a recombinant vWF-A domain from human factor B: a solution study by circular dichroism, fourier transform infrared and (1)H NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 298, 135–147.
- Hoylaerts, M.F., Yamamoto, H., Nuyts, K., Vreys, I., Deckmyn, H. and Vermeylen, J. (1997) Von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem. J.* 324, 185–191.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J. and Gros, P. (1997) Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* 5, 1147–1156.
- Huizinga, E.G., Tsuji, S., Romijn, R.A., Schiphorst, M.E., de Groot, P.G., Sixma, J.J. and Gros, P. (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 297, 1176–1179.
- Ikezono, T., Omori, A., Ichinose, S., Pawankar, R., Watanabe, A. and Yagi, T. (2001) Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1535, 258–265.
- Ikezono, T., Shindo, S., Ishizaki, M., Li, L., Tomiyama, S., Takumida, M., Pawankar, R., Watanabe, A., Saito, A., and Yagi, T. (2005) Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat.* 67, 252–258.

- Ikezono, T., Shindo, S., Li, L., Omori, A., Ichinose, S., Watanabe, A., Kobayashi, T., Pawankar, R. and Yagi, T. (2004) Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 440–446.
- Kalluri, R., Gattone, V.H., and Hudson, B.G. (1998) Identification and localization of type IV collagen chains in the inner ear cochlea. *Connect. Tissue Res.* 37, 143-50.
- Kamarinos, M., McGill, J., Lynch, M. and Dahl, H. (2001) Identification of a novel COCH mutation, I109N, highlights the similar clinical features observed in DFNA9 families. *Hum. Mutat.*, 17, 351.
- Kaplan, F., Ledoux, P., Kassamali, F.Q., Gagnon, S., Post, M., Koehler, D., Deimling, J., and Sweezy, N.B. (1999) A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor derived trypsin inhibitor. *Am. J. Physiol.* 276, L1027-L1036.
- Kemperman, M.H., De Leenheer, E.M.R., Huygen, P.L.M., van Duijnhoven, G., Morton, C.C., Robertson, N.G., Cremers, F.P.M., Kremer, H. and Cremers, C.W.R.J. (2005) Audiometric, vestibular, and genetic aspects of a DFNA9 family with a G88E COCH mutation. *Otol. Neurotol.*, 26, 926–933.
- Khetarpal, U. (1993) Autosomal dominant sensorineural hearing loss. Further temporal bone findings. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 119, 106-108.
- Manolis, E.N., Yandavi, N., Nadol, J.B. Jr., Eavey, R.D., McKenna, M., Rosenbaum, S., Khetarpal, U., Halpin, C., Merchant, S.N., Duyk, G.M., MacRae, C., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (1996) A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet.* 5:1047-50.
- Khetarpal, U. (2000) DFNA9 is a progressive audiovestibular dysfunction with a microfibrillar deposit in the inner ear. *Laryngoscope* 110, 1379–1384.
- Kochhar, A., Hildebrand, M S., and Smith, J. H. R. (2007) Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med*, 9, 393-408.

- Kommareddi, P.K., Nair, T.S., Raphael, Y., Telian, S.A., Kim, A.H., Arts, H.A., et al. (2007) Cochlin isoforms and their interaction with CTL2 (SLC44A2) in the inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 8, 435–446.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J.S., Vermunt, A.M., Pain, A., Sauerwein, R.W., Eling, W.M., Hall, N., Waters, A.P., Stunnenberg, H.G., and Mann, M. (2002) Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* 419, 537-542.
- Lee, J.-O., Bankston, L.A., Arnaout, M.A. and Liddington, R.C., 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation?. *Structure*. 3, 1333–1340.
- Li, L., Ikezono, T., Watanabe, A., Shindo, S., Shindo, R., Pawankar, R., and Yagi, T. (2005) Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* 32, 219-223.
- Liepinsh, E., Trexler, M., Kaikkonen, A., Weigelt, J., Bánya, L., Patthy, L., et al. (2001) NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J.* 20, 5347–5353.
- Lin X., Takahashi, K., Campion, S. L., Liu, Y., Gustavsen, G. G., Penˆa, L. A., and Zamora, P. O. (2006) Synthetic peptide F2A4-K-NS mimics fibroblast growth factor-2 in vitro and is angiogenic in vivo. *Int. J. Mol. Med.* 17, 833–839.
- Lukachovich, T.R., Boros, I., and Venetianer, P. (1987) New regulatory features of the promoters of an *Escherichia coli* rRNA gene. *J. Bacteriol.* 169, 272-277.
- Makishima, T., Rodriguez, C.I., Robertson, N.G., Morton, C.C., Stewart, C.L. and Griffith, A.J. (2005) Targeted disruption of mouse Coch provides functional evidence that DFNA9 hearing loss is not a COCH haploinsufficiency disorder. *Hum. Genet.* 118, 29–34.

- Mayne, R., Ren, Z.X., Liu, J., Cook, T., Carson, M., and Narayana, S. (1999) VIT-1: the second member of a new branch of the von Willebrand factor A domain superfamily. *Biochem. Soc. Trans*, 27, 832-835.
- Milder, F.J., Raaijmakers, H.C., Vandeputte, M.D., Schouten, A., Huizinga, E.G., Romijn, R.A., Hemriks, W., Roos, A., Daha, M.R., and Gros, P. (2006) Structure of complement component C2a: implications for convertase formation and substrate binding. *Structure*. 14, 1587-97.
- Mizuta, K., Ikezono, T., Iwasaki, S., Arai, M., Hashimoto, Y., Pawankar, R., et al. (2008) Ultrastructural co-localization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal. *Neurosci. Lett.* 434, 104–107.
- Nagata, K., and Handa, H. (2000) Real-time analysis of biomolecular interactions. Springer-Verlag, Tokyo.
- Pauw, R.J., Huygen, P.L., Collin, R.W., Cruysberg, J.R., Hoefsloot, L.H., Kremer, H. and Cremers, C.W. (2007) Phenotype description of a novel DFNA9/COCH mutation, I109T. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 116, 349–357.
- Robertson, N.G., Cremers, C.W., Huygen, P.L., Ikezono, T., Krastins, B., Kremer, H., et al. (2006) Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1071–1085.
- Robertson, N.G., Jones, S.M., Sivakumaran, T.A., Giersch, A.B., Jurado, S.A., Call, L.M., Miller, C.E., Maison, S.F., Liberman, M.C. and Morton, C.C. (2008) A targeted Coch missense mutation: a knock-in mouse model for DFNA9 late-onset hearing loss and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3426–3434.
- Robertson, N.G., Khetarpal, U., Gutierrez-Espeleta, G.A., Bieber, F.R. and Morton, C.C. (1994) Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics*, 23, 42–50.
- Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N., Eavey, R.D., McKenna, M., et al. (1998) Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat. Genet.* 20, 299–303.

- Robertson, N.G., Resendes, B.L., Lin, J.S., Lee, C., Aster, J.C., Adams, J.C. and Morton, C.C. (2001) Inner ear localization of mRNA and protein products of COCH, mutated in the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2493–2500.
- Robertson, N.G., Skvorak, A.B., Yin, Y., Weremowicz S, Johnson KR, Kovatch KA, Battey JF, Bieber FR, and Morton CC. (1997) Mapping and characterization of a novel cochlear gene in human and in mouse: a positional candidate gene for a deafness disorder, DFNA9. *Genomics*.46: 345-54.
- Romijn, R.A., Bouma, B., Wuyster, W., Gros, P., Kroon, J., Sixma, J.J., et al. (2001) Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J. Biol. Chem.* 276, 9985–9991.
- Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J., et al. (2003) Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J. Biol. Chem.* 278,15035–15039.
- Sambrook, J. and Russell D.W.(2001) A Molecular Cloning Manual, 2nd Ed., by Cold Spring Harbor Laboratory.
- Satoh, H., Kawasaki, K., Kihara, I., and Nakano, Y. (1998) Importance of type IV collagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan in the regulation of labyrinthine fluid in the rat cochlear duct. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 255, 285-288.
- Slepecky, N.B., Cefaratti, L.K., and Yoo, T.J. (1992) Type II and type IX collagen form heteropyc fibers in the tectorial membrane of the inner ear. *Matrix.* 12, 80-86.
- Slepecky, N.B., Savage, J.E., Cefaratti, L.K., and Yoo, T.J.(1992) Electron-microscopic localization of type II, IX, and V collagen in the organ of Corti of the gerbil. *Cell. Tissue. Res.* 267, 413-8.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, CDSSTR methods with expanded reference set. *Anal Biochem.* 287, 252-260.

- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W. (2001) Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. *Anal Biochem.* 299, 271-274.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W.(1999) Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using CD spectroscopy. *Protein Sci.* 8, 370-380.
- Street, V.A., Kallman, J.C., Robertson, N.G., Kuo, S.F., Morton, C.C. and Phillips, J.O. (2005) A novel DFNA9 mutation in the vWFA2 domain of COCH alters a conserved cysteine residue and intrachain disulfide bond formation resulting in progressive hearing loss and site-specific vestibular and central oculomotor dysfunction. *Am. J. Med. Genet. A.*, 139, 86–95.
- Tebo, A.E., Szankasi, P., Hillman, T.A., Litwin, C.M. and Hill, H.R. (2006) Antibody reactivity to heat shock protein 70 and inner ear-specific proteins in patients with idiopathic sensorineural hearing loss. *Clin. Exp. Immunol.*, 146, 427–432.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T. (1994) CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 12. 4673-4680.
- Trexler, M., Bányai, L. and Patthy, L. (2000) The LCCL module. *Eur. J. Biochem.* 267, 5751–5757.
- Tsuprun, V. and Santi, P. (2001) Proteoglycan arrays in the cochlear basement membrane. *Hearing Research*, 157, 65-76.
- Tuckwell, D.S., Reid, K.B., Barnes, M.J. and Humphries, M.J. (1996) The A-domain of integrin  $\alpha 2$  binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif. *Eur. J. Biochem.* 241, 732–739.
- Usami, S., Takahashi, K., Yuge, I., Ohtsuka, A., Namba, A., Abe, S., Fransen, E., Patthy, L., Otting, G. and Van Camp, G. (2003) Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet*, 11, 744–748.



- Verhagen, W.I., Bom, S.J., Fransen, E., Van Camp, G., Huygen, P.L., Theunissen, E.J., and Cremers, C.W. (2001) Hereditary cochleovestibular dysfunction due to a COCH gene mutation (DFNA9): a follow-up study of a family. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 26:477-83.
- Verstreken, M., Declau, F., Wuyts, F.L., D'Haese P., Van Camp, G., Fransen, E., Van Den Hauwe, L., Buyle, S., Smets, R.E., Feenstra, L., Van Der Stappen, A., and Van De Heyning, P.H. (2001) Hereditary otovestibular dysfunction and Meniere's disease in a large belgian family is caused by a missence mutation in the COCH gene. *Otol Neurotol.* 22, 874-81.
- Whittaker, C.A., and Hynes, R.O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell.* 13, 3369-87.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., et al. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151–155.
- Yuan, H.J., Han, D.Y., Sun, Q., Yan, D., Sun, H.J., Tao, R., Cheng, J., Qin, W., Angeli, S., Ouyang, X.M. et al. (2008) Novel mutations in the vWFA2 domain of COCH in two Chinese DFNA9 families. *Clin. Genet.*, 73, 391–394.

# Közlemények

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Nagy, I.,** Horváth, M., Trexler, M., Répássy, G., and Patthy, L. (2004) A novel *COCH* mutation, V104del, impairs folding of the LCCL domain of cochlin and causes progressive hearing loss.

*J. Med. Genet.* **41**:e9. IF:4,112

**Nagy, I.,** Trexler, M., and Patthy, L. (2008) The second von Willebrand type A domain of cochlin has high affinity for type I, type II, and type IV collagens.

*FEBS Letters.* **582**, 4003-7. IF:3,263

## Idézettség

1. Street, VA, Kallman, JC, Robertson, NG, Kuo, SF, Morton, CC and Phillips, JO. (2005) A novel DFNA9 mutation in the vWFA2 domain of COCH alters a conserved cysteine residue and intrachain disulfide bond formation resulting in progressive hearing loss and site-specific vestibular and central oculomotor dysfunction. *Am. J. Med. Genet. A*, 139A, 86-95.

2. Makishima, T, Rodriguez, CI, Robertson, NG, Morton, CC, Stewart, CL and Griffith, AJ. (2005) Targeted disruption of mouse Coch provides functional evidence that DFNA9 hearing loss is not a COCH haploinsufficiency disorder. *Hum. Genet.*, 118, 29-34.

3. Kemperman, MH, De leenheer, EMR, Huygen, PLM, van duijnhoven, G, Morton, CC, Robertson, NG, Cremers, FPM, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2005) Audiometric, vestibular, and genetic aspects of a DFNA9 family with a G88E COCH mutation. *Otol. Neurotol.*, 26, 926-33.

4. Collin, RWJ, Pauw, RJ, Schoots, J, Huygen, PLM, Hoefsloot, LH, Cremers, CWRJ and Kremer, H. (2006) Identification of a novel COCH mutation, G87W, causing autosomal dominant hearing impairment (DFNA9). *Am. J. Med. Genet. A*, 140A, 1791-4.

5. Robertson, NG, Cremers, CWRJ, Huygen, PLM, Ikezono, T, Krastins, B, Kremer, H, Kuo, SF, Liberman, MC, Merchant, SN, Miller, CE, Nadol, JB, Sarracino, DA, Verhagen, WIM and Morton, CC. (2006) Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1071-85.

6. Yan, D, Ke, X, Blanton, SH, Ouyang, XM, Pandya, A, Du, LL, Nance, WE and Liu, XZ. (2006) A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *J. Med. Genet.*, 43, 170-4.

7. Bischoff, AMLC, Pauw, RJ, Huygen, PLM, Aandekerck, AL, Kremer, H, Cremers, CWRJ and Cruysberg, JRM. (2007) Vertical corneal striae in families with autosomal dominant hearing loss DFNA9/COCH. *Am. J. Ophthalmol.*, 143, 847-52.
8. Pauw, RJ, Huygen, PLM, Collin, RWJ, Cruysberg, JRM, Hoefsloot, LH, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2007) Phenotype description of a novel DFNA9/COCH mutation, I109T. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 116, 349-57.
9. Pauw, RJ, Collin, RWJ, Huygen, PLM, Hoefsloot, LH, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2007) Clinical characteristics of a Dutch DFNA9 family with a novel COCH mutation, G87W. *Audiol. Neurotol.*, 12, 77-84.
10. Kommareddi, PK, Nair, TS, Raphael, Y, Telian, SA, Kim, AH, Arts, HA, El-kashlan, HK and Carey, TE. (2007) Cochlin isoforms and their interaction with CTL2 (SLC44A2) in the inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 8, 435-46.
11. Picciani, R, Desai, K, Guduric-fuchs, J, Cogliati, T, Morton, CC and Bhattacharya, SK. (2007) Cochlin in the eye. Functional implications. *Prog. Retin. Eye. Res.*, 26, 453-69.
12. Yuan, HJ, Han, DY, Sun, Q, Yan, D, Sun, HJ, Tao, R, Cheng, J, Qin, W, Angeli, S, Ouyang, XM, Yang, SZ, Feng, L, Cao, J, Feng, GY, Wang, YF, Dai, P, Zhai, SQ, Yang, WY, He, L and Liu, XZ. (2008) Novel mutations in the vWFA2 domain of COCH in two Chinese DFNA9 families. *Clin. Genet.*, 73, 391-4.
13. Williamson, RE, Darrow, KN, Giersch, ABS, Resendes, BL, Huang, M, Conrad, GW, Chen, ZY, Liberman, MC, Morton, CC and Tasheva, ES. (2008) Expression studies of osteoglycin/mimecan (OGN) in the cochlea and auditory phenotype of Ogn-deficient mice. *Hear. Res.*, 237, 57-65.
14. Robertson, NG, Jones, SM, Sivakumaran, TA, Giersch, ABS, Jurado, SA, Call, LM, Miller, CE, Maison, SF, Liberman, MC and Morton, CC. (2008) A targeted Coch missense mutation: a knock-in mouse model for DFNA9 late-onset hearing loss and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 3426-34.
15. Street, VA, Kallman, JC, Strombom, PD, Bramhall, NF and Phillips, JO. (2008) Vestibular function in families with inherited autosomal dominant hearing loss. *J. Vestib. Res.*, 18, 51-8.

## Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemény

**Nagy, I., Trexler, M., and Patthy, L.** (2003) Expression and characterization of the olfactomedin domain of human myocilin.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 554-61. IF:2,836

## Idézettség

1 Kanagavalli, J, Krishnadas, SR, Pandaranayaka, E, Krishnaswamy, S and Sundaresan, P. (2003) Evaluation and understanding of myocilin mutations in Indian primary open angle glaucoma patients *Mol Vis*, 9, 606-14.

2. Zenga, LC, Han, ZG and Ma, WJ. (2005) Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS Lett.*, 579, 5443-53.
3. Aroca-aguilar, JD, Sanchez-sanchez, F, Ghosh, S, Coca-prados, M and Escribano, J. (2005) Myocilin mutations causing glaucoma inhibit the intracellular endoproteolytic cleavage of myocilin between amino acids Arg(226) and Ile(227). *J. Biol. Chem.*, 280, 21043-51.
4. Ando, K, Nagano, T, Nakamura, A, Konno, D, Yagi, H and Sato, M. (2005) Expression and characterization of disulfide bond use of oligomerized A2-pancortins: Extracellular matrix constituents in the developing brain. *Neuroscience*, 133, 947-57.
5. Liu, WL, Chen, L, Zhu, JC and Rodgers, GP. (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell. Res.*, 312, 1785-97.
6. Gobeil, S, Letarte, L and Raymond, V. (2006) Functional analysis of the glaucoma-causing TIGR/myocilin protein: Integrity of amino-terminal coiled-coil regions and olfactomedin homology domain is essential for extracellular adhesion and secretion. *Exp. Eye Res.*, 82, 1017-29.
7. Vollrath, D and Liu, YH. (2006) Temperature sensitive secretion of mutant myocilins. *Exp. Eye Res.*, 82, 1030-6.
8. Park, BC, Shen, X, Fautsch, M, Tibudan, M, Johnson, D and Yue, BYJT. (2006) Optimized bacterial expression of myocilin proteins and functional comparison of bacterial and eukaryotic myocilins. *Mol. Vis.*, 12, 832-40.
9. Hillier, BJ, Sundaresan, V, Stout, CD and Vacquier, VD. (2006) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the olfactomedin domain from the sea urchin cell-adhesion protein amassin. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 62, 16-9.
10. Hillier, BJ and Vacquier, VD. (2007) S 5a8; structural features and functional domains of amassin-1, a cell-binding olfactomedin protein. *Biochem. Cell Biol.*, 85, 552-62.
11. Maertens, B, Hopkins, D, Franzke, CW, Keene, DR, Bruckner-tuderman, L, Greenspan, DS and Koch, M. (2007) Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of Ranvier formation. *J. Biol. Chem.*, 282, 10647-59.
12. Sakai, H, Shen, X, Koga, T, Park, BC, Noskina, Y, Tibudan, M and Yue, BYJT. (2007) Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells. *J. Cell Physiol.*, 213, 775-84.
13. Coca-prados, M and Escribano, J. (2007) New perspectives in aqueous humor secretion and in glaucoma: The ciliary body as a multifunctional neuroendocrine gland. *Prog. Retin. Eye Res.*, 26, 239-62.
14. Kurgan, L. (2008) On the relation between the predicted secondary structure and the protein size. *Protein J.*, 27, 234-9.
15. Mackay, EO, Kallberg, ME and Gelatt, KN. (2008) Aqueous humor myocilin protein levels in normal, genetic carriers, and glaucoma Beagles. *Vet. Ophthalmol.*, 11, 177-85.
16. Pandaranayaka, PJE, Kanagavalli, J, Krishnadas, SR, Sundaresan, P and Krishnaswamy, S. (2008) Over expression and purification of recombinant human myocilin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 903-7.

# **A DFNA9 típusú öröklődő hallásvesztés molekuláris biológiai vizsgálata**

## **Összefoglaló**

Az SZBK Enzimológiai Intézetének Funkcionális Genomika munkacsoportja 2000-ben definiálta önálló szerkezettel rendelkező doménként az LCCL modult, amelyet különböző multidomén fehérjék építőelemeként egyre több fehérjében azonosítanak. LCCL domén megtalálható a belső fül extracelluláris mátrixának fő komponensében a cochlin fehérjében. A cochlin egy LCCL domént és két A típusú von Willebrand faktor domént tartalmaz. Kimutatták, hogy a cochlin LCCL doménjében lokalizálódó mutációk DFNA9 típusú öröklődő halláskárosodást okoznak, ezért munkacsoportunkban szerkezet-funkció vizsgálatok kezdődtek az LCCL domén betegség kialakulásában betöltött szerepének és a halláskárosodás patomechanizmusának tisztázására.

A kutatásokba bekapcsolódva célul tűztem ki további LCCL domént érintő, DFNA9 betegséget okozó mutációk azonosítását a magyar populációban. Ennek eredményeként egy betegnél azonosítottam egy heterozigóta formában megjelenő mutációt, amely a 104. valin in-frame delécióját eredményezte az LCCL doménben. A betegséget okozó mutációk hatásának vizsgálatához expresszáltam a 104delV mutáns és a korábban azonosított, még nem vizsgált I109N mutáns LCCL doméneket. Az expresszió során nem alakult ki a natív fehérjére jellemző szerkezet, a mutánsok oldhatatlan aggregátum formájában kicsapódtak. A mutációk káros hatása a domén szerkezetének kialakításában fontos szerkezeti elemek destabilizálásában nyilvánul meg. Ezek az eredmények tovább bizonyítják a mutációk funkcionyeréses mechanizmus általi hatását: a hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérjék jelenléte okozhatja a betegséget.

A cochlin fehérje biológiai funkciójának és a hallásban betöltött szerepének megértéséhez célul tűztem ki a humán cochlin fehérje doménjei és a belső fül extracelluláris mátrixának komponensei között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatát. Ennek során megállapítottam, hogy a humán cochlin C-terminális A típusú von Willebrand faktor doménje (vWFA2) kölcsönhatást alakít ki a humán I., II., és IV. típusú kollagénnel, a cochlin LCCL doménje azonban nem kötődik egyik vizsgált kollagén típushoz sem. A humán cochlin vWFA2 doménje és a II. kollagén közötti kölcsönhatás meghatározásával megerősítettem, hogy ez a kölcsönhatás fontos szerepet játszik a cochlea és vestibulum homeosztázisának fenntartásában. Az eredmények alapján lehetséges, hogy a cochlin és a belső fül extracelluláris mátrix komponensei között kialakuló kölcsönhatásokat elimináló mutációk gátolják a cochlin fehérje funkciójának betöltését.

# **Molecular biology of the hereditary hearing loss DFNA9**

## **Summary**

In 2000 using *in silico* methods, the Functional Genomics Group of the Institute of Enzymology, BRC, HAS, identified the LCCL module as an autonomous folding domain that has been used for the construction of various modular proteins. The inner ear extracellular protein, cochlin contains one LCCL domain and two von Willebrand factor type A domains (vWFA). Mutations in the LCCL domain of human cochlin cause autosomal dominant hearing loss DFNA9. In view of the central role of this domain in deafness we initiated studies to explore the molecular basis of the DFNA9 hearing loss.

At first I initiated mutation screening in the Hungarian population to identify novel mutations in the LCCL domain that cause DFNA9 deafness. One person was identified to be heterozygous for a novel mutation that resulted in the deletion of a valine residue without causing frame-shift. In order to examine the effect of the mutations I expressed the LCCL domain carrying the 104delV and the formerly identified I109N mutation. These mutants, similarly to most others impair the ability of the LCCL domain to form the native structure affecting essential structural elements. These results further support the notion that mutations act through a gain of function mechanism: it is the presence of the abnormal protein that causes the disease.

In order to explore the biological role of cochlin in the normal hearing process, my aim was to investigate the interactions of the different domains of human cochlin with the extracellular matrix components of the inner ear. I have shown that the second von Willebrand factor type A domain (vWFA2) of human cochlin has high affinity for type I, II, and IV collagens, whereas the LCCL domain displayed no detectable affinity for these types of collagens. The interaction of the vWFA2 domain with the type II collagen confirms earlier suggestions that such an interaction may play a crucial role in the structural homeostasis of the cochlea and vestibule.

My results raise the possibility that mutations eliminating cochlin's interaction with extracellular matrix components of the inner ear may interfere with normal cochlear function.

## **Csatolt közlemények**